



Excès de Phosphore et de Matières organiques naturelles dans les eaux de retenues : diagnostic et remèdes Cas du lac de Ribou à Cholet, (Maine-et-Loire, France)

Frédéric de Nardi

► To cite this version:

Frédéric de Nardi. Excès de Phosphore et de Matières organiques naturelles dans les eaux de retenues : diagnostic et remèdes Cas du lac de Ribou à Cholet, (Maine-et-Loire, France). Autre. Université d'Angers, 2009. Français. NNT : . tel-00461461

HAL Id: tel-00461461

<https://theses.hal.science/tel-00461461>

Submitted on 4 Mar 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT
Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université d'Angers

Spécialités : Chimie Analytique et Bioprocédés

ECOLE DOCTORALE 3 MPL

Excès de Phosphore et de Matières organiques naturelles
dans les eaux de retenues : diagnostic et remèdes
Cas du lac de Ribou à Cholet, (Maine-et-Loire, France)

Présentée publiquement par :

Frédéric DE NARDI

à Cholet (Maine-et-Loire, 49)

Le : 10/07/09

Devant le Jury composé de :

M. Daniel VILLESSOT (Président du jury, Examineur), Directeur Scientifique,
Lyonnais des eaux

M. Jacques FRERE (Rapporteur), Professeur, Université de Poitiers

M. Jacques HAURY (Rapporteur), Professeur, Agrocampus de Rennes

M. Philippe SIMONEAU (Examineur), Professeur, Université d'Angers

M. Pierre FRERE (Directeur de Thèse, Examineur), Professeur, Université d'Angers

M. Maxime PONTIE (Co-directeur de Thèse), Professeur, Université d'Angers

M. Thierry LODE (Co-directeur de Thèse), Professeur, Université d'Angers

M. Bernard PARINET (Co-encadrant de Thèse), MCF-HDR, Université de Poitiers

M. Philippe COUTANT (invité), Ingénieur, Directeur Environnement, Communauté
d'Agglomération du Choletais

M. Christophe PUAUD (Invité), Ingénieur, Communauté d'Agglomération du Choletais

Laboratoire GEPEA, UMR-CNRS -6144, 2 Bd. Lavoisier 49045 Angers cedex 01

Remerciements

Mes travaux de thèse ont été financés par la Communauté d'Agglomération du Choletais (CAC), je tenais à remercier tout d'abord la collectivité pour m'avoir permis de réaliser mon doctorat. Je remercie aussi Michel BASLE, Professeur à la faculté de médecine d'Angers, ancien VP recherche, pour l'attribution de cette bourse des collectivités territoriales.

J'adresse d'abord un grand remerciement à Maxime Pontié (directeur de thèse) pour toute l'énergie qu'il a dépensé pour l'encadrement au quotidien de mes travaux de thèse, à commencer par son accueil au sein du laboratoire de Génie des Procédés pour l'Environnement et l'Agroalimentaire (GEPEA, UMR-CNRS 6144) jusqu'à la correction du manuscrit *via* les réunions scientifiques et les colloques. Je n'oublie pas les agréables moments passés durant ces 3 années qui ont été certainement les plus enrichissantes de ma jeune carrière scientifique et toute l'équipe du GAP.

Je tiens à remercier ensuite Thierry Lodé (Co-directeur de thèse) pour ses précieux conseils qui m'ont accompagné durant mes travaux et aussi pour avoir partagé sa bonne humeur. Je lui souhaite un prompt rétablissement.

Je tiens aussi à remercier Bernard Parinet (Co-encadrant) pour m'avoir très bien accueilli au sein du laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau (LCME) de l'Université de Poitiers en début d'année 2008 et pour avoir partagé ses connaissances scientifiques, ce qui m'a permis de compléter mes travaux de thèse par une approche originale.

Je n'oublie pas d'adresser mes remerciements à Robert Filmon et toute l'équipe du service de microscopie de l'université d'Angers (SCIAM) dont Romain et Sonia qui ont contribué à l'évolution de mes travaux.

Je remercie fortement Christophe PUAUD pour m'avoir apporté des connaissances extérieures à l'université qui étaient à la fois scientifique et aussi politique, sans oublier les bons moments passés ensemble avec toute l'équipe « environnement » de la CAC.

J'adresse un remerciement particulier aux membres du Jury, à commencer par les professeurs Jacques Frère (Université de Poitiers) et Jacques Haury (Agrocampus de Rennes) qui ont accepté le rôle de rapporteur.

Je suis également très honoré par la présence dans le jury de Monsieur Daniel Villessot (Lyonnaise des eaux, examinateur), des Professeurs Pierre Frère (Université d'Angers, examinateur) et Philippe Simoneau (Université d'Angers, examinateur), ainsi que par la présence de Philippe Coutant (CAC, Directeur de l'environnement, Invité).

Merci également à MM. Jack Legrand et Pascal Jaouen, respectivement directeur du GEPEA et responsable de l'équipe Bioprocédés et Séparation en milieu marin du GEPEA à l'université de Nantes-St Nazaire pour m'avoir accepté dans leur laboratoire.

Encore un merci, à tous les étudiants avec lesquels j'ai collaboré au sein du Groupe Analyses et Procédés : Stéphane et Marie pour les inventaires, Isabelle, Olivier et Florian pour les expériences en réacteurs à biofilms en présence de nitrates et Elvis pour les microélectrodes à pesticides.

J'adresse un ultime remerciement à mes parents, à toute ma famille, à tous mes amis qui m'ont toujours soutenu dans cette voie et à ma chère et tendre future dont je ne connais pas encore le nom !

« Je dédie spécialement ce travail de thèse à celui qui fût l'incarnation de la bonté même, à un être qui m'a été très cher, à qui je dois tout et qui nous a brusquement quitté le 02/03/09. Mes pensées resteront à jamais tourner vers lui. RIP »

A mon père,

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1: Cycle du phosphore (De Nardi, d'après Sigg <i>et coll</i> , 2000)..... | 11 |
| Figure 2 : Diagramme de prédominance des formes du phosphore dans les eaux..... | 14 |
| Figure 3 : Structure moléculaire générale des microcystines (Web 4)..... | 17 |
| Figure 4 : Principe de d'élimination du P par les bactéries déphosphatantes | 19 |
| Figure 5 : Evolution de la concentration moyenne pondérée de phosphore total, contenu dans le lac Léman (Blanc et coll, 1999 ; Sigg et coll, 2000). | 20 |
| Figure 6 : Suivi de la qualité de l'eau au sein du bassin versant de Ribou. Conception : De Nardi Frédéric (D'après CAC, 2007)..... | 22 |
| Figure 7: Cycle du carbone dans les eaux naturelles (D'après Sigg <i>et coll</i> , 2000)..... | 24 |
| Figure 8 : Voie de formation des substances humiques (D'après Stevenson 1982, cité par Amir, 2005) | 26 |
| Figure 9 : Répartition des fractions du COD des eaux de surface selon Leenheer (1981) | 27 |
| Figure 10 : Protocole d'extraction de la MO..... | 30 |
| Figure 11 : Qualité des eaux vis-à-vis de la MO (oxydabilité au KMnO_4) sur l'ensemble du bassin versant de Ribou durant l'année 2006..... | 31 |
| Figure 12 : Schéma des principaux mécanismes réactionnels intervenant dans la déphosphatation d'un effluent par les scories d'aciéries (Comeau <i>et coll</i> , 2006)..... | 40 |
| Figure 13 : Schéma des procédés d'épuration associant une lagune à un filtre de végétaux (Steinmann et coll, 2002) | 43 |
| Figure 14 : Photographie et représentation schématique de l'installation d'un marais artificiel | 44 |
| Figure 15 : Courbe schématisant la croissance d'un biofilm au cours du temps | 50 |
| Figure 16 : Schéma représentant les étapes de développement d'un biofilm (Web 7) | 52 |
| Figure 17: présentation du Bassin versant du Ribou..... | 62 |
| Figure 18 : Bilan annuel moyen des apports en eau (Coyne et Bélier, 1994)..... | 63 |
| Figure 19 : a/ Détermination de l'aire minimale b/ Courbe représentant le nombre d'espèces végétales en fonction de la dimension du quadrat..... | 64 |
| Figure 20: Dénombrements des algues et cyanobactéries en suspension et au sein du biofilm | 68 |
| Figure 21 : Schéma du bioréacteur à biofilm sur billes de verres | 69 |
| Figure 22: Intensités en fonction de la vitesse de Rotation..... | 72 |
| Figure 23 : Schéma de montage des mesures d'intensités en fonction des vitesses de rotation | 74 |
| Figure 24 : Matrice de fluorescence type d'une eau douce filtrée sur $0,22 \mu\text{m}$ obtenue à l'aide du logiciel Sigma plot. | 75 |
| Figure 25 : Protocole d'extraction de la matière organique dissoute à l'aide des résines XAD 8 et XAD 4 | 77 |
| Figure 26 : Module de filtration frontale mis au point au laboratoire..... | 80 |
| Figure 27 : La cellule de Thoma | 81 |
| Figure 28 : Sources carbonées contenues dans chaque puits de biolog GN2. | 82 |
| a/ Réacteurs sans biofilms b/Réacteurs avec biofilms | 85 |
| Figure 29 : Schéma du bioréacteur en circuit fermé | 85 |
| Figure 30 : Suivis des concentrations en phosphore au niveau des 3 stations (TR, AV, ZB) (précision $\pm 0,05 \text{ mg/L}$)..... | 88 |
| Figure 31 : Suivis des concentrations en MO oxydable au niveau des 3 stations (TR, AV, ZB) (précision $\pm 0,2 \text{ mg/L}$)..... | 88 |
| Figure 32 : Composantes principales 1 et 2 de l'ensemble des données physico-chimiques du lac de Ribou de janv. 2000 à juin 2006 | 90 |

| | |
|---|-----|
| Figure 33 : Zone de confluence entre le Trézon et le lac de Ribou (Mai 2006)..... | 91 |
| Figure 34 : Graphique représentant l'évolution du nombre d'espèces végétales en fonction de la dimension du quadrat. | 93 |
| Figure 35 : Délimitation des parcelles sur lesquelles ont été effectués les relevés pour déterminer le recouvrement floristique. | 94 |
| Figure 36 : Recouvrement végétal de la zone inondable à la confluence Trézon-Ribou (fin mai 2006)..... | 95 |
| Figure 37 : Recouvrement de <i>Rorippa amphibia</i> à la confluence Trézon-Ribou (fin mai 2006). | 96 |
| Figure 38 : Recouvrement de <i>Salix</i> sp. à la confluence Trézon-Ribou (fin mai 2006)..... | 96 |
| Figure 39: Inventaire floristique réalisé sur l'ensemble du lac de Ribou (octobre 2006)..... | 99 |
| (La Station TR est entourée de noir) | 99 |
| Figure 40 : Observations au MEB des biofilms épiphytiques prélevés in situ (Station TR) (SCIAM, Octobre 06)..... | 101 |
| Figure 41 : Histogrammes représentant l'abondance relative entre les algues, les diatomées et les cyanobactéries au sein des biofilms épiphytiques et dans l'eau au niveau des 3 stations en fonction des dates de prélèvements. | 105 |
| Figure 42 : Abondance relative entre les algues, les diatomées et les cyanobactéries au sein des biofilms et dans l'eau au niveau de 3 stations en fonction du temps d'immersion des supports bambous..... | 107 |
| Figure 43 : Illustration de l'évolution des biofilms naturels sur supports bambous | 108 |
| Figure 44 : Influence du support sur la colonisation par les algues, les diatomées et les cyanobactéries. | 110 |
| Figure 45: Proportions des éléments chimiques présents au sein de l'espèce <i>Phalaris arundinacea</i> | 111 |
| Figure 46 : Proportions des éléments chimiques présents à la surface d'une tige immergée de l'espèce <i>Phalaris arundinacea</i> avec du biofilm..... | 112 |
| Figure 47 : Evolution des proportions des éléments chimiques présents au sein d'un biofilm à la surface d'un support bambou immergé (ZB). | 113 |
| Figure 48 : Evolution des proportions des éléments chimiques présents au sein d'un biofilm à la surface d'un support bambou immergé (AV et TR)..... | 114 |
| Figure 49 : Composition chimique d'un biofilm issu d'un support plastique..... | 115 |
| Figure 50 : Spectre EDX du support plastique..... | 115 |
| Figure 51 : Répartition des éléments chimiques majeurs (Mn, Si, Al, Fe , Ca) au sein de biofilms par microanalyses X (date du prélèvement Mars 2007, Station ZB)..... | 116 |
| Figure 52 : Répartition des éléments chimiques (Si, Mn, Fe, Al, Ca, Cl , P, K) au sein de biofilms par microanalyses X (date du prélèvement Mars 2007, Station ZB)..... | 117 |
| Figure 53 : Répartition des éléments chimiques (Si, Mn, Fe, Al, Ca, S , P, K) au sein de biofilm par microanalyses X (date du prélèvement Mars 2007, Station ZB)..... | 118 |
| Figure 54 : Répartition des éléments chimiques (Si, Mn) au sein de biofilm par microanalyses X (date du prélèvement Octobre 2006, Station TR)..... | 118 |
| Figure 55 : Répartition des éléments chimiques (Mn, Si, Ca, S) au sein de biofilm par microanalyses X (date du prélèvement Octobre 2006, Station TR)..... | 118 |
| Figure 56 : Répartition des éléments chimiques (Mn, Si, Ca) au sein de biofilm par microanalyses X (date du prélèvement Octobre 2006, Station TR)..... | 118 |
| Figure 57 : Analyse MEB/EDX d'un biofilm épiphytique | 120 |
| Figure 58 : Evolution des concentrations en carbone et azote au cours du temps (jours) avant et après passage dans le bioréacteur. | 127 |
| Figure 59: Fractionnement des différentes eaux avant et après passage dans un bioréacteur | 129 |

| | |
|---|-----|
| Figure 60 : Suivi des fluorophores A et C au sein d'une eau de station à t=0jours et à t=13 jours de colonisation (précision 1%) | 130 |
| Figure 61: Suivi des fluorophores B et T au sein d'une eau de station à t=0jours (eau alimentation) et à t=13 jours de colonisation (récupération) (précision 1 %)..... | 131 |
| Figure 62 : Evolution des intensités de fluorescence des fluorophores B et T dans les eaux d'entrée AV fractionnées (EHPO, ETPH et EHPI) et de récupération (RHPO, RTPH et RHPI) (précision 1 %)..... | 132 |
| Figure 63 : Evolution des intensités de fluorescence des fluorophores B et T dans les eaux d'entrée ZB fractionnées (EHPO, ETPH et EHPI) et de récupération (RHPO, RTPH et RHPI) (précision 1 %)..... | 133 |
| Figure 64 : Evolution des intensités de fluorescence des fluorophores B et T dans les eaux fractionnées TR2 d'entrée (EHPO, ETPH et EHPI) et de récupération (RHPO, RTPH et RHPI) (précision 1 %)..... | 133 |
| Figure 65 : Spectres de fluorescence des fractions HPI d'entrée et de récupération après 10 jours de colonisation sur billes de verres au sein du bioréacteur | 134 |
| Figure 66 : Pyrochromatogrammes des fractions HPO issues des eaux d'entrée et de récupération (eau de station AV) | 135 |
| Figure 67 : Pyrochromatogrammes des fractions TPH issues des eaux d'entrée et de récupération (eau de station AV) | 137 |
| Figure 68 : Evolution des concentrations en Phosphore avant et après passage dans le bioréacteur (t=10jours) à partir des eaux prélevées à différentes stations (Précision : +/- 5 µg/L)..... | 139 |
| Figure 69 : Evolution des concentrations de Na, Ca, K, Mg et Si à t=0jours (alimentation) et à t=10jours (sortie, récupération) pour les eaux des différentes stations (précision : +/- 0,5 mg/L) | 141 |
| Figure 70 : Evolution des concentrations de Mn, Al, Fe et Zn à t=0jours (alimentation) et à t=10jours (sortie, récupération) dans les eaux des différentes stations (précision : +/- 5 µg/L)..... | 142 |
| Figure 71 : Abondance relative entre les différentes espèces présentes avant et après passage dans le bioréacteur et au sein du biofilm TR2 correspondant (E : entrée, R : récupération) | 145 |
| Figure 72: Abondance relative entre les différentes espèces présentes avant et après passage dans le bioréacteur et au sein du biofilm ZB correspondant (E : entrée, R : récupération) | 146 |
| Figure 73 : Abondance relative entre les différentes espèces présentes avant et après passage dans le bioréacteur et au sein du biofilm AV correspondant (E : entrée, R : récupération) | 147 |
| Figure 74 : Evolution des populations totales de bactéries avant et après passage dans le pilote (précision de la méthode : ± 10 %)..... | 148 |
| Figure 75 : ACP représentant la projection des stations TR, AV, ZB sur plusieurs jours dans le plan des 2 premières composantes | 151 |
| Figure 76 : ACP représentant la projection des stations TR, AV, ZB sur plusieurs jours dans le plan des composantes 1 et 3 | 152 |
| Figure 77 : ACP représentant la projection des stations TR, AV, ZB sur plusieurs jours dans le plan des composantes 1 et 4 | 153 |
| Figure 78 : Etude des états de surface des billes de verre (support à biofilms) | 154 |
| Figure 79: Suivis de la croissance de biofilms par mesures de ses épaisseurs en fonction du temps (solution de Ferri/Ferro 0,01 M, vitesse de rotation 300 tr/min, E=-0,05V/ECS) | 155 |
| Figure 80 : Teneurs en carbone et en azote au sein des biofilms | 156 |

| | |
|---|-----|
| Figure 81 : Matrices d'Excitation-Emission de fluorescence 3D réalisées à partir de biofilms mis en suspension dans de l'EUP..... | 159 |
| Figure 82: Teneurs en éléments chimiques ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) des biofilms | 160 |
| Figure 83 : Détermination des indices d'incorporation pour chaque élément chimique | 161 |
| Figure 84 : Concentrations des éléments chimiques au sein d'un biofilm..... | 162 |
| Figure 85 : Comparaison entre deux techniques d'analyses : EDX et ICP-OES..... | 164 |
| Figure 86 : Comparaison entre la composition chimique d'un biofilm élaboré dans un bioréacteur et d'un biofilm épiphytique (station TR et ZB) (précision 5 %). | 165 |
| Figure 87 : Abondance relative entre algues, diatomées et cyanobactéries (en nombre d'individus) au sein des biofilms étudiés | 166 |
| Figure 88 : Population totale de bactéries présentes dans les biofilms. | 167 |
| Figure 89 : Etude des profils métaboliques des communautés microbiennes présentes dans les biofilms élaborés dans le bioréacteur. | 168 |
| Figure 90 : Etude des profils métaboliques des communautés microbiennes présentes dans les eaux d'hiver utilisées pour l'alimentation du bioréacteur. | 169 |
| Figure 91 : Etude des profils métaboliques des communautés microbiennes présentes dans les eaux de récupération (après passage dans le bioréacteur). | 170 |
| Figure 92 : Etude des profils métaboliques des communautés microbiennes présentes dans les eaux d'été. | 170 |
| Figure 93 : Etude des profils métaboliques des communautés microbiennes au sein de biofilms épiphytiques. | 172 |
| Figure 94 : Diagramme de projection des variables représentant des familles de substrats consommés | 174 |
| Figure 94 bis: Projection des individus (eaux, biofilms) dans le plan pour 24h (noté 0), 48h (noté 1) et 72h (noté 2) d'incubation..... | 177 |
| Figure 95 : Diagramme représentant la projection des individus (biofilms) dans le plan | 179 |
| Figure 96: Diagramme de projection des variables dans le plan caractérisant la MO | 182 |
| Figure 97: Diagramme de projection des biofilms dans le plan..... | 183 |
| Figure 98: Composition des eaux du BV selon les campagnes de prélèvement | 187 |
| Figure 99 : Composition des biofilms selon les campagnes de prélèvements (précision : $\pm 5\%$) | 188 |
| Figure 100 : Biofilms épiphytiques (<i>Phalaris arundinacea</i>) issus de différentes stations au niveau du BV du Trézon | 189 |
| Figure 101 : Illustration de la surface de bambous colonisés au niveau de la station T. | 190 |
| Figure 102 : Illustration de la surface de bambous colonisés au niveau de la station ASTEP. | 191 |
| Figure 103 : Composition du phytoplancton dans l'eau et au niveau du biofilm (bambou).. | 192 |
| Figure 104 : Biofilm sur supports bambous (18 juin 2007) | 193 |
| Figure 105 : Illustration obtenue par MEB de la composition de l'eau préalablement filtrée sur membrane (18 juin 2007). | 194 |
| Figure 106: Suivi de la composition chimique au sein d'un biofilm sur bambous..... | 195 |
| Figure 107: Evolution des proportions de Fer, de Mn et de Si au cours de l'élaboration d'un biofilm naturel (station T) | 195 |
| Figure 108 : Représentation des stations et des variables par ACP réalisée sur l'ensemble des données du Bassin Versant..... | 197 |
| Figure 109: Diagramme à deux composantes représentant la projection des individus (stations de prélèvement situées sur le Bassin Versant) (Représentation des stations en noir : Mars ; en bleu : Avril ; en vert : Mai ; en rose : Juin) | 198 |
| Figure 110 : Nombre de corrélations entre les différentes variables dont $r > 0,6$ | 201 |
| Figure 111 : Voltammogrammes de détection du paranitrophénol..... | 202 |

| | |
|--|-----|
| Figure 112 : Evolution de la concentration en nitrates au cours du temps dans les réacteurs à biofilm et témoin. | 204 |
| Figure 113 : Abondance relative entre diatomées, algues et cyanobactéries | 205 |
| Figure 114: Abondance relative entre les communautés de diatomées avant et après dopage en nitrates au sein d'un biofilm (3 jours d'expositions)..... | 206 |
| Figure 115 : Abondance relative entre les communautés de diatomées avant et après dopage en nitrates au sein d'un biofilm (7 jours d'exposition). | 207 |
| Figure 116: Illustration des biofilms sur le garnissage en verre du bioréacteur (observations réalisées au MEB à 3 keV)..... | 208 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Classes de qualités et d'aptitudes des eaux de rivières pour la production d'Eau destinée à la Consommation Humaine (D'après Simonet, 2001 ; Web 3)..... | 8 |
| Tableau 2 : Principales origines du phosphore présent dans les eaux classées par activités et selon le mode de rejet (Neveu et coll, 2001) | 13 |
| Tableau 3 : Caractérisation et typologie des sources de phosphore | 14 |
| Tableau 4 : Concentrations usuelles du CO sous les formes COD et COP rencontrées dans les eaux (Sigg <i>et coll</i> , 2000) | 25 |
| Tableau 5 : Pourcentage de carbone biodégradable d'une eau de surface (Labanowski, 2004) | 29 |
| Tableau 6 : Dénominations des principaux fluorophores selon leur origine..... | 33 |
| Tableau 7 : Origines et fragments de pyrolyse caractéristiques des principaux biopolymères (Bruchet <i>et coll</i> , 1990 ; Leenheer et Croué, 2003 ; Demeusy, 2007) | 34 |
| Tableau 8 : Liste des macrophytes sensibles et tolérants retrouvés au niveau des lacs Européens (d'après Penning <i>et coll</i> , 2008)..... | 38 |
| Tableau 9 : Comparaison des espèces phytoplanctoniques présentes dans les eaux « propres » et les eaux enrichies en MO. | 47 |
| Tableau 10 : Code couleur en fonction du recouvrement des végétaux..... | 65 |
| Tableau 11 : Analyses physico-chimiques effectuées dans l'eau d'alimentation et de récupération (les eaux brutes sont décantées) | 71 |
| Tableau 12 : Analyses physico-chimiques effectuées pour l'étude du biofilm (mis en suspension dans l'EUP. | 71 |
| Tableau 13 : Suivis des paramètres physico-chimiques sur le lac de Ribou..... | 87 |
| Tableau 14 : Espèces végétales répertoriées au cours de l'année 2006 (mai et octobre)..... | 92 |
| Tableau 15 : Résultat obtenu suite à la méthode de Braun-Blanquet permettant de connaître la surface du quadrat à utiliser pour la détermination de l'abondance des espèces. | 92 |
| Tableau 16 : Analyses physico-chimiques de l'eau issue de la station TR..... | 98 |
| Tableau 17 : Tableau récapitulatif de la présence – absence de biofilms sur les échantillons prélevés respectivement en mai et octobre 2006..... | 100 |
| Tableau 18 : Suivis des paramètres physico-chimiques sur les 3 stations | 102 |
| (le signe - dans le tableau signifie une absence de données)..... | 102 |
| Tableau 19 : Abondance relative des produits de dégradation de pyrolyse entre les fractions d'entrée (E) et de récupération (R) (HPO et TPH) (précision 2 %) | 138 |
| Tableau 20: Valeurs moyennes de 4 paramètres physico-chimiques : pH, Conductivité, Température et Turbidité pour les stations TR à deux périodes, AV et ZB..... | 143 |
| Tableau 21 : Matrice des composantes établie à partir des paramètres physico-chimiques et microbiologiques | 149 |
| Tableau 22 : Analyses semi-quantitatives des principaux pics communs à tous les biofilms (précision 2 %) | 157 |
| Tableau 23 : Comparaison des principaux pics entre des échantillons de biofilms et de MO mis en évidence par pyrolyse CG/SM (P indique la présence d'un produit) | 158 |
| Tableau 24. Matrice des composantes établie à partir des familles de substrats..... | 173 |
| Tableau 25: Matrice des composantes établie à partir des paramètres physico-chimiques ... | 178 |
| Tableau 26 : Matrice des composantes établie à partir des paramètres organiques..... | 181 |
| Tableau 27 : Matrice des composantes établie à partir des paramètres physico-chimiques et microbiologiques | 199 |

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| <u>CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</u> | 5 |
| I.1/ LE PHOSPHORE DANS LES EAUX DOUCES | 11 |
| I.1.1/ Origines | 11 |
| I.1.2/ Les différentes formes du phosphore dans les eaux | 14 |
| I.1.3/ Conséquences des excès de phosphore dans les retenus | 15 |
| I.1.3.1/ Processus d'eutrophisation et de prolifération de cyanobactéries | 15 |
| I.1.3.2/ Les toxines | 16 |
| I.1.4/ Les stratégies actuelles de réduction du phosphore | 18 |
| I.1.4.1/ Les moyens préventifs | 18 |
| I.1.4.2/ Les moyens curatifs | 18 |
| I.1.4.3/ Amélioration de la qualité de l'eau | 20 |
| I.1.4.3.1/ Cas du lac Léman (Suisse) | 20 |
| I.1.4.3.2/ Cas du lac de Ribou à Cholet (Maine-et-Loire, France) | 21 |
| I.2/ LA MATIERE ORGANIQUE DANS LES EAUX NATURELLES | 24 |
| I.2.1/ Origines et caractéristiques de la MO | 24 |
| I.2.2/ Les substances humiques | 26 |
| I.2.3/ biodégradabilité | 28 |
| I.2.4/ Fractionnement de la MO sur résine XAD-4 et XAD-8 | 30 |
| I.2.5/ La problématique MO dans l'eau du lac de Ribou à Cholet | 31 |
| I.2.6/ Outils analytiques permettant d'étudier la MO | 32 |
| I.2.6.1/ La fluorimétrie 3D | 32 |
| I.2.6.2/ Le couplage : Pyrolyse/ chromatographie en phase gazeuse/ détection de masse | 33 |
| I.2.5.3/ L'analyse par composante principale (ACP) | 35 |
| I.3/ LES MACROPHYTES : DES BIOINDICATEURS DE LA QUALITE DES EAUX | 36 |
| I.4/ L'EPURATION DES EAUX PAR LES MACROPHYTES | 39 |
| I.4.1/ Les procédés physico-chimiques | 39 |
| I.4.2/ Les procédés biologiques | 41 |
| I.4.2.1/ Mécanismes de l'épuration biologique | 41 |
| I.4.2.2/ Le lagunage | 42 |
| I.4.2.3/ Le lagunage associé à un filtre planté de macrophytes | 42 |

| | |
|---|-----------|
| I.4.2.4/ Les marais artificiels | 44 |
| I.5/ LES BIOFILMS | 45 |
| I.5.1/ Définition | 45 |
| I.5.2/ Composition | 45 |
| I.5.2.1/ Composition biologique | 45 |
| I.5.2.1.1/ Les bactéries | 45 |
| I.5.2.1.2/ Les algues | 46 |
| I.5.3.1.3/ Les algues à parois de silicium : les diatomées | 46 |
| I.5.3.1.4/ Composition biologique des eaux propres et des eaux eutrophes | 47 |
| I.5.2.2/ Composition minérale | 48 |
| I.5.2.2.1/ Le fer | 48 |
| I.5.2.2.2/ Le manganèse | 49 |
| I.5.2.2.3/ Les carbonates | 49 |
| I.5.2.2.4/ Le silicium | 50 |
| I.5.2.2.5/ Les silicates | 50 |
| I.5.2.3/ Formation du biofilm | 50 |
| I.5.2.3.1/ Les différentes étapes | 50 |
| I.5.3.2.2/ Les substances polymères extracellulaires (EPS) | 52 |
| I.5.3.2.3/ Liaisons intermoléculaires non covalentes et stabilités des biofilms | 53 |
| I.5.3/ Les outils analytiques de caractérisations des biofilms | 53 |
| I.5.3.1/ Les supports à biofilms | 53 |
| I.5.3.2/ Les outils analytiques | 53 |
| I.5.3.2.1/ La Microscopie électronique et la microanalyse X | 53 |
| I.5.3.2.2/ Méthodes de Dénombrements de microorganismes | 54 |
| I.5.3.2.3/ Les outils de mesures d'épaisseurs de biofilm | 54 |
| I.5.3.2.4/ Les biologi GN2 | 55 |
| I.5.3.2.5/ Les bioréacteurs à biofilms | 55 |
| I.6/ LES MACROPHYTES ET LES BIOFILMS | 56 |
| I.6.1/ Efficacité des macrophytes et des biofilms dans l'élimination des nutriments | 56 |
| I.6.2/ Comparaison entre biofilm épiphytique, sédiment et colonne d'eau | 59 |
| I.6.3/ Effet de la végétation sur l'élimination des bactéries en solution | 59 |
| I.6.4/ L'épuration par l'utilisation de supports à biofilm | 60 |
| <u>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES</u> | 61 |
| II.1/ LE LAC DE RIBOU ET SON BASSIN VERSANT | 62 |
| II.2/ INVENTAIRES FLORISTIQUES PAR LA METHODE DES QUADRATS | 64 |

| | |
|--|------------|
| II.3/ OUTILS D'ANALYSES DE SURFACE : MEB ET EDX POUR L'ETUDE DES BIOFILMS | 65 |
| II.3.1/ Préparation des échantillons | 65 |
| II.3.2/ Observation des biofilms épiphytiques au MEB | 67 |
| II.3.3/ MEB – Analyses chimiques des biofilms par Microanalyse EDX | 67 |
| II.4/ DENOMBREMENTS D'ALGUES, DE DIATOMEES ET DE CYANOBACTERIES | 67 |
| II.5/ ETUDE DES BIOFILMS ELABORES EN LABORATOIRE | 69 |
| II.5.1/ Schéma de montage du bioréacteur à billes de verres | 69 |
| II.5.2/ Protocole de décrochage des biofilms | 70 |
| II.5.3/ Suivis des paramètres physico-chimiques | 70 |
| II.5.4/ Détermination des épaisseurs de biofilms par des mesures électrochimiques (Forêt et coll, 2006) | 71 |
| II.5.5/ Dosage du COT, COD, Azote total et dissous | 74 |
| II.5.6/ Analyse de la MO par fluorimétrie 3D et pyrolyse GC-MS | 75 |
| II.5.7/ Fractionnement de la MO sur résine XAD-4 et XAD-8 | 76 |
| II.5.8/ Minéralisation des biofilms pour le dosage des métaux | 78 |
| II.5.9/ Dosages des minéraux et du P par ICP-OEP | 79 |
| II.5.10/ Détermination des teneurs en élément chimique X dans les biofilms | 79 |
| II.5.11/ Suivis des paramètres microbiologiques | 80 |
| II.5.11.1/ Dénombrements d'algues, de diatomées et de cyanobactéries | 80 |
| II.5.11.2/ Détermination de la population totale en bactéries | 81 |
| II.5.11.3/ Détermination des profils métaboliques des communautés de microorganismes présentes dans les eaux et les biofilms par biolog GN2. | 82 |
| <u>CHAPITRE III : DIAGNOSTIC SUR LE LAC DE RIBOU</u> | 86 |
| III.1/ LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES SUIVIS AU COURS DES MOIS | 87 |
| III.2/ L'ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE : UN OUTIL D'AIDE AU DIAGNOSTIC | 89 |
| III.3/ LES INVENTAIRES FLORISTIQUES | 91 |
| III.3.1/ Etat des lieux sur la zone de confluence Trézon-Ribou (zone inondable) | 91 |
| III.3.2/ Détermination de l'aire minimale requise | 92 |
| III.3.3/ Etat des lieux sur le lac de Ribou | 98 |
| III.4/ ETUDE DES BIOFILMS EPIPHYTIQUES NATURELS | 100 |
| III.4.1/ Mise en évidence de biofilm sur les hélophytes répertoriées (Station TR) | 100 |
| III.4.2/ Evolution de la composition en algues, en diatomées et en cyanobactéries durant l'année 2007 | 102 |
| III.4.2.1/ Evolution des paramètres Physico-chimiques au niveau des 3 stations | 102 |

| | |
|--|------------|
| III.4.2.2/ Dans l'eau et sur le support végétal : <i>Phalaris arundinacea</i> | 104 |
| III.4.2.3/ Dans l'eau et sur le support en bambou | 106 |
| III.4.2.4/ Influence du support sur la colonisation. | 109 |
| III.4.3/ Suivis de la composition chimique des biofilms | 110 |
| III.4.3.1/ L'analyse semi-quantitative par EDX | 110 |
| III.4.3.2/ Etude de la répartition par élément chimique | 116 |
| <u>CHAPITRE IV :IMPACTS DES BIOFILMS NATURELS SUR LES EAUX</u> | |
| <u>ANTHROPISEES</u> | 123 |
| IV.1/ SUIVIS DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DANS LES EAUX AVANT ET APRES PASSAGE AU SEIN DU BIOREACTEUR | 125 |
| IV.1.1/ Evolution des concentrations en COT, COD, et d'azote total et dissous au sein des eaux étudiées | 125 |
| IV.1.2/ Fractionnement des eaux après passage sur résine XAD-8 et XAD-4. | 128 |
| IV.1.2.1/ Proportion de COD entre les fractions hydrophobes, hydrophiles et transphiliques. | 128 |
| IV.1.3/ Evolution des fluorophores A et C puis B et T | 130 |
| IV.1.3.1/ Evolution des fluorophores A et C | 130 |
| IV.1.3.2/ Evolution des fluorophores B et T | 131 |
| IV.1.3.3/ Comparaison des fluorophores B et T à partir des eaux préalablement fractionnées | 132 |
| IV.1.4/ Etude des extraits de MO lyophilisés (fractions HPO et TPH) par pyrolyse CG-SM | 134 |
| IV.1.4.1/ Comparaison des fractions HPO d'entrée et de récupération | 135 |
| IV.1.4.2 / Les fractions TPH en entrée et récupération | 136 |
| IV.1.4.3/ Etude semi-quantitative entre certains fragments de pyrolyse caractéristique des fractions HPO et TPH | 137 |
| IV.1.5/ Suivis des éléments majeurs et mineurs par ICP-OEP | 139 |
| IV.1.5.1/ Dosage du phosphore total par ICP-OES | 139 |
| IV.1.5.2/ Suivis des éléments majeurs | 140 |
| IV.1.5.3/ Suivi des éléments mineurs au sein de l'eau | 142 |
| IV.2/ SUIVIS DES PARAMETRES MICROBIOLOGIQUES DANS LES EAUX | 145 |
| IV.2.1/ Dénombrement d'algues, de diatomées et de cyanobactéries | 145 |
| IV.2.2/ Détermination de la population totale bactérienne | 148 |
| IV.3/ ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES BIOFILMS | 154 |
| IV.3.1/ Etude du supports et effet du traitement par les ultrasons | 154 |
| IV.3.2/ Détermination des épaisseurs de biofilms par mesures électrochimiques | 155 |
| IV.3.3/ Composition en COT, COD, Azote total et dissous | 156 |
| IV.3.4/ Etude des biofilms par pyrolyse CG-SM | 156 |

| | |
|---|------------|
| IV.3.5/ Comparaison des biofilms et des fractions HPO et TPH des eaux d'alimentation et de récupération (station AV) par pyrolyse GC/MS | 158 |
| IV.3.6/Etude des biofilms par fluorimétrie 3D | 159 |
| IV.3.7/ Composition en éléments majeurs et mineurs (ICP-OEP et analyse EDX) | 160 |
| IV.3.7.1/ Teneurs en éléments chimiques des biofilms | 160 |
| IV.3.7.2/ Comparaison entre 2 méthodes analytiques : EDX et ICP-OES. | 163 |
| III.3.7.3/ Comparaison entre biofilms épiphytiques et biofilms en bioréacteur | 164 |
| IV.4/ ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DES BIOFILMS | 166 |
| IV.4.1/ Dénombrement d'algues, de diatomées et de cyanobactéries | 166 |
| IV.4.2/ Détermination de la population totale en bactéries | 166 |
| IV.4.3/ Profils métaboliques des communautés de microorganismes par biologs GN2 | 168 |
| IV.4.3.1/ Profils métaboliques des microorganismes selon les origines | 168 |
| IV.4.3.2/ Analyses des biologs GN2 par ACP | 173 |
| <u>CHAPITRE V : ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE</u> | 185 |
| V.1/ DIAGNOSTIC A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT | 186 |
| V.1.1/ Etude des communautés dans l'eau et au sein des biofilms | 186 |
| V.1.2/ Composition des espèces entre biofilm et eau issus d'un même site | 192 |
| V.1.3/ Etude de la composition chimique | 195 |
| V.1.4/ Bilan Bassin versant : synthèse des données obtenues par ACP | 196 |
| V.2/ DIAGNOSTIC ET REMEDE A L'ECHELLE DE LABORATOIRE | 201 |
| V.2.1/ Diagnostic et remèdes via les biofilms | 201 |
| V.2.2/ Caractérisation des biofilms avant et après dopage en nitrates. | 204 |
| CHAPITRE VI : DISCUSSION | 209 |
| CONCLUSION GENERALE | 220 |
| PERSPECTIVES | 225 |
| ANNEXES | 227 |

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac Hex : Acide hexadecanoïque
ACP : Analyse en Composante Principale
AF : Acide(s) Fulvique(s)
AH : Acide(s) humique(s)
BV : Bassin Versant
Chlo a : Chlorophylle a
COT : Carbone Organique total
COD : Carbone Organique dissous et COP : Carbone Organique Particulaire
E : Eau d'entrée ou d'alimentation du bioréacteur
EDX : Energy Dispersive X-Ray
EHPI : Fraction hydrophile dans les eaux d'alimentation
EHPO : Fraction hydrophobe dans les eaux d'alimentation
ETPH : Fraction transphilique dans les eaux d'alimentation
EUP: Eau Ultra Pure
hexad : hexadecenamide
HPI : Hydrophile
HPO : Hydrophobe
IBD : Indice biologique diatomée
IBGN : Indices Biologiques Généraux Normalisés
MEB : Microscopie électronique à balayage
MET : Microscopie électronique à transmission
MO : Matière(s) organique(s)
MON : Matière(s) organique(s) naturelle
N : Azote
octaD : octadecenamide
P : Phosphore
PNP: Paranitrophénol
Ptot : Phosphore total
Pyrolyse CG-SM : pyrolyse chromatographie gaz- détection à spectre de masse
R : Eau de récupération : il s'agit de l'accumulation des sorties dans le réservoir
RHPI : Fraction hydrophile dans les eaux de récupération
RHPO : Fraction hydrophobe dans les eaux de récupération
RTPH : Fraction transphilique dans les eaux de récupération
S : Eau de Sortie du bioréacteur
SAU : Surface Agricole Utile
SH : Substance(s) humique(s)
TPH : Tranphilique
UGB: Unité de gros bétails
2EH : 2-éthyl-1-hexanol
3acetaF: 3 acetamidofuran
5MFC : 5-méthylfurancarboxaldéhyde

INTRODUCTION GENERALE

Les transformations des paysages, la destruction des habitats et les apports anthropiques excessifs contribuent à l'altération de tous les compartiments de l'environnement et particulièrement les ressources naturelles en eau.

Sur l'ensemble des continents, la pollution des eaux représente un problème majeur. En effet les ressources en eau contiennent souvent des excès de nitrates, de phosphore (P), de matières organiques (MO), d'hydrocarbures, de produits phytosanitaires et de métaux lourds (Zn, Cu, Fer, Mn, Hg) qui doivent être mieux contrôlés car ils peuvent avoir des conséquences néfastes sur les qualités de vie des milieux aquatiques. Toutefois, un habitat de type zone humide est capable d'absorber ces pollutions dans une assez grande mesure grâce notamment à des processus de transformations biochimiques qui participent à l'épuration des milieux naturels. Cependant, soumis à des apports trop importants (ruissellement, lessivage) le milieu naturel ne peut tout absorber car les capacités épuratoires du milieu sont limitées. Des phénomènes tels que l'eutrophisation apparaissent alors et sont la traduction d'un bouleversement des équilibres du milieu. Parmi les éléments qui contribuent à ce phénomène, le P, l'azote (sous formes de nitrates ou d'ions ammonium) et les MO, occupent une place très importante. L'excès de P en particulier est un facteur important qui intervient de façon majeure dans l'apparition périodique des « blooms » de cyanobactéries dans les eaux. Ces microorganismes photosynthétiques sont capables de produire des cyanotoxines (par exemple, les microcystines LR) dangereuses pour l'homme et les animaux. Ainsi le phosphore en excès favorise la production primaire puis induit indirectement un apport conséquent de matières organiques par les exsudations ou la décomposition des cyanobactéries.

C'est la situation que rencontrent actuellement de nombreuses communes françaises et européennes où les retenues d'eau présentent une prolifération des microalgues et des excès de nombreux polluants ainsi que des quantités de matières organiques importantes (carbone organique total, COT, >10 mg/L), qui posent des problèmes majeurs pour la valorisation de ces sites comme bases de loisirs ou bien comme réserve d'eau destinée à la consommation humaine (EdCH).

Le lac de Ribou à Cholet, situé au sud du département du Maine-et-Loire (49), est un cas typique illustrant cette problématique. D'une part, ce lac constitue une réserve d'eau destinée à la production d'eau potable. D'autre part, sur le site, une base de loisirs a été aménagée rapidement après la construction du barrage. Toutefois le label *eau de baignade* qui

existait a été perdu en 2003 en raison d'une part de la turbidité élevée de l'eau dont les cyanobactéries sont partiellement responsables et aussi en raison de pics épisodiques de microcystine LR et les risques sanitaires associés. En effet, ce lac artificiel subit périodiquement des problèmes de « blooms » de cyanobactéries qui altèrent la qualité de l'eau brute. Pour sortir de l'eutrophisation, il faudrait d'une part diminuer d'un facteur 10 environ les apports annuels de P (actuellement 18,7 Tonnes/an) dans les eaux des rivières alimentant la retenue d'eau (le Trézon et la Moine) et d'autre part diminuer la présence de cet élément accumulé depuis plusieurs années dans les sédiments.

Un plan de gestion pour la période 2006-2010 du captage de Ribou s'insérant dans un Schéma d'Aménagement de la Gestion des Eaux (SAGE) a fixé des objectifs d'amélioration de la qualité de l'eau en proposant une trentaine d'actions en mettant en œuvre les moyens humains et financiers nécessaires pour les atteindre. Ces actions consistent notamment à sensibiliser les principaux acteurs du bassin versant (BV) à cette double problématique et à connaître les origines des apports excessifs de phosphore.

Actuellement, des solutions sont en cours dans le but d'éviter les pertes de P et de MO par ruissellement et lessivage à l'échelle des parcelles et pour l'ensemble du Bassin Versant (mise en place de zone tampons aménagées telles les prairies et les bandes enherbées) et de réduire globalement les quantités apportées. Un suivi des paramètres physico-chimiques et biologiques des eaux est également effectué chaque mois afin de mieux comprendre l'origine des flux de phosphore P et de MO à l'échelle du BV et faire un suivi de l'amélioration de la qualité des eaux eu égard aux actions mises en œuvre dans le cadre du SAGE.

Ces travaux de thèse participent donc pleinement au plan de gestion 2006-2010 et ont pour objectif d'apporter des solutions afin de répondre à cette double problématique : « excès de P et de MO », et tenter d'améliorer la qualité des eaux de la retenue de Ribou. Des auteurs ont indiqué que les plantes ont la capacité d'enlever les nutriments de l'environnement : la phytoremédiation. Il y a 5 types de phytoremédiation identifiés (Pulford & Watson, 2003) :

- La phytoextraction où les plantes enlèvent les métaux du sol et les concentrent dans les parties supérieures de la plante ;
- La phytodégradation où les plantes et les microorganismes associés dégradent les pollutions organiques. Mann et Wetzel (2000) ont démontré que la dégradation de la matière organique dissoute par les bactéries, est significativement meilleure dans les zones peuplées de végétaux que dans les zones non végétalisées. En effet, les macrophytes aquatiques relarguent de l'oxygène dans le milieu environnant, facilitant

ainsi l'oxydation des nutriments par les bactéries du milieu aquatique et entraînant une prolifération de celles-ci.

- La rhizofiltration où les racines des plantes absorbent les métaux issus des rejets ;
- La phytostabilisation où les plantes réduisent la mobilité et la biodisponibilité des polluants dans l'environnement, soit par immobilisation, soit en empêchant leur migration ;
- La phytovolatilisation où les polluants sont envoyés dans l'atmosphère via les plantes.

Les plantes aquatiques occupent une place importante dans différents écosystèmes d'eau douce. De plus, des influences naturelles et anthropogènes affectent la distribution et l'abondance des plantes aquatiques. Les espèces de plantes aquatiques varient beaucoup selon leur anatomie, leur physiologie, les propriétés de leur cycle vital, et leur capacité à tolérer les agents stressants biologiques ou inorganiques. Les régimes extrêmes de flux, d'irradiations, de salinités, de températures, de nutriments et de polluants, sont des exemples clés d'agents stressants. Ces agents associés à la compétition, à la présence des herbivores comme les poissons, les tortues, les invertébrés (Pipalova, 2002) et les maladies causées notamment par des champignons (Muelstein et coll, 1991), peuvent également limiter la capacité des espèces à utiliser des habitats, par ailleurs convenables. Certaines plantes aquatiques ont une distribution cosmopolite et montrent de hauts degrés de polymorphisme et de plasticité, en réaction aux variations des facteurs environnementaux; ces qualités leur permettent de vivre sous une large gamme de conditions. D'autres espèces ont cependant des tolérances plus étroites et sont potentiellement utiles comme indicatrices des conditions du milieu, en termes soit de leur présence ou soit de leur abondance relative dans les communautés. Les influences environnementales affectent les plantes aquatiques, elles peuvent être utilisées potentiellement comme indicatrices d'une qualité d'eau, aux échelles locales, des bassins versants ou des régions (Lacoul et Freedman, 2006).

. Il semble donc pertinent de connaître les espèces végétales d'un milieu aquatique pour savoir lesquelles présentent à leur surface du biofilm et ainsi d'en connaître leurs impacts dans les eaux de surface.

Dans le cadre de notre étude, nous avons supposé que les macrophytes sont de bons « candidats » pour éliminer le P et les biofilms, pour éliminer la MO. L'objectif de ce travail est d'évaluer comment l'association macrophytes / microorganismes pourrait intervenir en tant que synergisme favorable à l'amélioration de la qualité des eaux de Ribou « en jouant naturellement » leur rôle épuratoire dans des zones humides aménagées (plantées) dans un objectif de restauration.

Ainsi, au cours de ces travaux nous avons étudié d'une part les macrophytes présents sur les berges de Ribou à travers la mise en oeuvre d'inventaires. De plus, des études sur les microorganismes (bactéries, algues) susceptibles de contribuer à la biodégradation de l'excès de MO ont été menées à la fois sur le terrain à travers là-aussi des inventaires des « biofilms épiphytiques » prélevés sur les macrophytes inventoriés et l'échelle de Ribou mais également à l'échelle du BV alimentant le Ribou. De plus, des expériences de laboratoire ont permis à travers la mise en oeuvre de bioréacteurs à biofilms l'étude de faisabilité des capacités épuratoires des biofilms, vis-à-vis des MO mais également de polluants inorganiques.

Le manuscrit est scindé en cinq chapitres :

- Le premier chapitre de **synthèse bibliographique** est consacré à un état de l'art sur les problématiques des excès de P et de MO dans les retenues d'eau et a pour vocation de montrer l'intérêt des macrophytes dans l'épuration des eaux de retenues et fait aussi l'état des connaissances actuelles sur les biofilms et en particulier les biofilms épiphytiques et leurs rôles dans l'épuration des milieux aquatiques anthropisés.
- Le chapitre II est le chapitre **Matériels et méthodes** où sont décrites toutes les techniques employées et les méthodologies mises en oeuvre au cours de ces travaux
- Le chapitre III concerne **une étude de diagnostic** des macrophytes et des microphytes présents au niveau de 3 stations du BV du Ribou, notées TR, AV et ZB.
- Le chapitre IV présente une approche quantitative pour montrer l'intérêt des biofilms naturels, produits en laboratoire à partir de prélèvements d'eaux naturelles de Ribou, pour l'épuration des polluants présents en excès
- Le dernier chapitre V constitue un chapitre « élargissement de l'étude » qui permet d'évoquer d'une part l'élargissement de l'étude réalisé à Ribou à l'ensemble du BV, à la fois au niveau des inventaires de la flore aquatique, mais également pour la caractérisation par les biofilms naturels de l'anthropisation des eaux du BV. Une synthèse des résultats entre les biofilms épiphytiques et les analyses d'eau est présentée via une analyse des données par la méthodologie de l'analyse en composantes principales (ACP) afin de

mettre en évidence des relations entre les biofilms et la composition de l'eau. D'autre part, des résultats préliminaires sont obtenus en laboratoire portant sur l'influence d'un polluant sur l'évolution d'un biofilm et son élimination (et/ou sa transformation) par ce dernier.

- Le Chapitre VI constitue le chapitre discussion pour mettre en évidence la pertinence de ce travail de thèse.

Le manuscrit s'achève par une synthèse de l'ensemble de nos travaux dans **la conclusion** et des **perspectives** de nos recherches sont avancées.

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

GENERALITES SUR LA QUALITE DES EAUX DE SURFACE

En France, il existe 525 000 km de cours d'eau de plus d'un kilomètre et 26 000 plans d'eau de plus d'un hectare (Miquel, 2003). L'eau de surface constitue une ressource non négligeable voire indispensable à de nombreux usages comme l'irrigation, la production d'eau destinée à la consommation humaine, son utilisation dans les procédés industriels ou les loisirs (baignade). Néanmoins, ces ressources en eau sont également des « réservoirs potentiels » pour les polluants organiques (pesticides, produits phytosanitaires, hydrocarbures) et inorganiques (nitrates, phosphates, métaux). Un polluant est défini comme un altéragène biologique, physique ou chimique, qui au delà d'un certain seuil (ou norme), et parfois dans certaines conditions, développe des impacts négatifs sur l'ensemble ou sur une partie d'un écosystème (Web 1). Les polluants sont majoritairement apportés dans les sols et les réseaux hydrographiques par les engrais, les élevages, les STEP, l'assainissement, les ruissellements urbains à l'échelle de bassin versant. Ce dernier est défini comme un territoire sur lequel toutes les gouttes de pluie s'écoulent puis se rejoignent en un même point pour former une rivière qui débouche sur un fleuve ou dans la mer. Ainsi, la dégradation de la qualité des eaux dans les bassins versants a pour d'éventuelles conséquences des impacts environnementaux dans les masses d'eau marines côtières provenant de pratiques sur les bassins versants d'une région donnée (Dorioz et Arousseau, 2007). Parmi les polluants, les nitrates et le phosphore provenant pour l'essentiel de l'agriculture et des effluents domestiques, mobilisent l'attention des acteurs impliqués dans la gestion de l'eau. Ils posent en effet des problèmes, tant au niveau de la dégradation de l'environnement résultant d'un envahissement par les végétaux, que des complications qu'ils engendrent lors de la production d'eau destinée à la consommation humaine (décret 03.01.89 : réglementation française). En Europe occidentale, les diverses réglementations relatives aux eaux continentales ont focalisé l'attention pendant des années sur des seuils de concentration et sur des raisonnements en concentration, puis les flux ont été pris en considération car les impacts environnementaux dans les eaux continentales et marines résultent de flux excessifs de macronutriments qui sont à l'origine des phénomènes d'eutrophisation. Le phénomène de développement des cyanobactéries dans les eaux douces a attiré de nouveau l'attention notamment sur le rôle du phosphore (P).

De plus, les polluants organiques sont également suivis dans les eaux brutes (pesticides, herbicides) car ils constituent des problématiques majeures. En effet, en Bretagne, depuis 2002, 59 prises d'eau sur 110 ont dépassé au moins une fois la limite réglementaire des

10 mg/L d'oxydabilité au KMnO_4 sur les eaux brutes (Web 2). Ces excès de matière organique (MO) engendrent des risques sanitaires et des difficultés de traitement lors de la production d'eau destinée à la consommation humaine avec une augmentation du coût de production. De plus, la matière organique favorise la formation de trihalométhanes ou d'acides haloacétiques à la toxicité reconnue et donne une couleur associée à un mauvais goût à l'eau. Enfin, la présence de MO favorise le développement de microorganismes dans les réseaux de distribution nuisant à la qualité sanitaire des eaux (problèmes de goûts, d'odeurs, contamination par des germes pathogènes).

Un système d'évaluation de la qualité des eaux des rivières (SEQ-Eau) est mis en œuvre dans le but d'évaluer la qualité de l'eau et son « aptitude » à assurer certaines fonctionnalités notamment la production d'eau destinée à la consommation humaine, les loisirs et les sports aquatiques, l'irrigation, l'abreuvement des animaux. Le SEQ-Eau est officialisé par le Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement en 1999 et commun à tous les gestionnaires de l'eau (Simonet, 2001). Le Tableau 1 montre les classes de qualités et d'aptitudes des eaux de rivières pour la production d'Eau destinée à la Consommation Humaine (EdCH).

Tableau 1 : Classes de qualités et d'aptitudes des eaux de rivières pour la production d'Eau destinée à la Consommation Humaine (D'après Simonet, 2001 ; Web 3)

| Classes d'aptitudes pour production d'eau potable | Critère de qualité pour les eaux de rivières | | | | | Norme eau potable |
|---|--|-------------------|----------------------|---------------------|---------------|-------------------------------|
| | Acceptable | Traitement simple | Traitement classique | Traitement complexe | Inapte | |
| Paramètres/Classe de qualité | Très bonne | Bonne | Passable | Mauvaise | Très mauvaise | Valeurs maximales admissibles |
| Oxygène dissous (mg/L) | 8 | 6 | 4 | 3 | > 3 | |
| Pourcentage de saturation (%) | 90 | 70 | 50 | 30 | > 30 | |
| DBO5 (mg/LO2) | 3 | 6 | 10 | 25 | > 25 | |
| DCO (mg/LO2) | 20 | 30 | 40 | 80 | > 80 | |
| KMnO4 (mg/LO2) | 3 | 5 | 8 | 10 | > 10 | |
| COD (mg/L) | 5 | 7 | 10 | 12 | > 12 | |
| NH4+ (mg/L) | 0,5 | 1,5 | 2,8 | 4 | > 4 | < 0,5 |
| NKj (mg/L) | 1 | 2 | 4 | 6 | > 6 | |
| Nitrates (mg/L) | 2 | 10 | 25 | 50 | > 50 | < 50 |
| Phosphates (mg/L) | 0,1 | 0,2 | 1 | 2 | > 2 | |
| Phosphore total (mg/L) | 0,05 | 0,5 | 0,5 | 1 | > 1 | < 5 |
| Pesticides (µg/L) | | | | | | <0,5 |
| | | | | | | <0,1 par pesticide |

Le Tableau 1 définit les critères de qualité d'une eau de rivière à partir de plusieurs paramètres physico-chimiques étudiés (MO, nitrates, phosphore). Les eaux sont classées en 5 catégories dépendantes du niveau de pollution. Les traitements appliqués pour la production d'EdCH à partir de l'eau brute se compliquent avec le niveau de pollution. En effet, pour une eau classée de mauvaises qualités, un traitement complexe et donc coûteux est nécessaire pour

produire de l'EdCH alors que pour une eau de bonne qualité, un traitement simple suffit avec des coûts moins importants.

Afin de préserver durablement les ressources en eau à cet usage, l'article L215-21 du Code de l'environnement français (Partie Législative) institue un « *programme pluriannuel d'entretien et de gestion* », dénommé « **plan simple de gestion** », qui peut être soumis à l'agrément du préfet (après avis, le cas échéant, de la commission locale de l'eau instituée en application de l'article L. 212-4) par tout propriétaire riverain d'un cours d'eau non domanial et toute association syndicale des riverains. Ce plan comprend :

- Un descriptif de l'état initial du cours d'eau, de son lit, des berges, de la faune et de la flore.
- Un programme annuel de travaux d'entretien et de curage et, si nécessaire, un programme de travaux de restauration, précisant notamment les techniques employées et les conséquences sur l'environnement.
- Un plan de financement de l'entretien, de la gestion et éventuellement des travaux.

Il existe à ce jour de nombreuses directives qui s'insèrent dans les **plans de gestion** afin d'améliorer la qualité des eaux au niveau des points de captages. Conformément à plusieurs directives européennes et à la loi sur l'eau de 1992, ces points de captage des eaux brutes pour produire de l'eau destinée à la consommation humaine doivent bénéficier d'un **périmètre de protection** afin d'éviter les pollutions liées aux activités humaines usuelles et accidentelle qui pourrait entraîner une contamination de l'eau et par conséquent une crise sanitaire. Pour chaque captage, un hydrogéologue indépendant et agréé en matière d'hygiène publique par le ministère chargé de la santé définit trois niveaux de protection représentés par trois types de périmètres. Le **périmètre de protection immédiate**, très restrictif, a pour objet d'empêcher la dégradation des ouvrages ou l'introduction directe de substances polluantes dans l'eau. Sa surface est donc très limitée : quelques centaines de mètres carrés. Le **périmètre de protection rapproché**, plus souple, doit protéger efficacement le captage vis-à-vis de la migration souterraine de substances polluantes. Sa surface dépend des caractéristiques de l'aquifère, des débits de pompage, de la vulnérabilité de la nappe. En France, le temps de transfert entre la pollution et le captage retenu est d'environ 50 jours, ce qui représente suivant les terrains une surface comprise entre 1 et 10 hectares. Sur ce périmètre, peuvent être interdites ou réglementées toutes les activités, installations et dépôts

susceptibles de nuire directement ou indirectement à la qualité des eaux. Enfin, le **périmètre de protection éloignée**, quant à lui, n'a pas de caractère obligatoire. Il renforce le périmètre précédent et peut couvrir une superficie très variable.

Ces périmètres de protection ont pour objectif de limiter les apports anthropiques dans les ressources en eau brute et notamment en nitrates, en phosphore et en MO. A ce jour, la question du phosphore dans l'environnement est devenue depuis quelques années en France l'une des questions environnementales majeures. Les raisons sont multiples :

- le principe de l'équilibre de fertilisation présent dans la directive cadre européenne Nitrate a été invoqué dans la réglementation française pour les nitrates et peu pour le phosphore.
- Le développement des phénomènes d'eutrophisation des eaux douces a contribué à attirer l'attention sur les flux et les concentrations de P dans les fleuves, lacs et retenues d'où l'intérêt de raisonner à l'échelle de bassin versant qui amène toutes les eaux tombant dans cette zone (Doriot et Aurousseau, 2007).

I.1/ LE PHOSPHORE DANS LES EAUX DOUCES

I.1.1/ Origines

Le phosphore (P) est un élément essentiel à la vie découvert par Hennig Brandt, et joue un rôle prédominant dans les cycles biologiques. Il est retrouvé dans les sols, les roches, les sédiments, les eaux et sous forme organique chez les végétaux et les animaux. Il intervient notamment dans la composition des acides nucléiques (ADN, ARN). Il représente 0,12 % des éléments constituant la croûte terrestre. Son cycle est unique parmi les cycles biogéochimiques majeurs, puisque la composante gazeuse est quasiment inexistante (phosphore d'hydrogène). La Figure 1 présente le cycle du P.

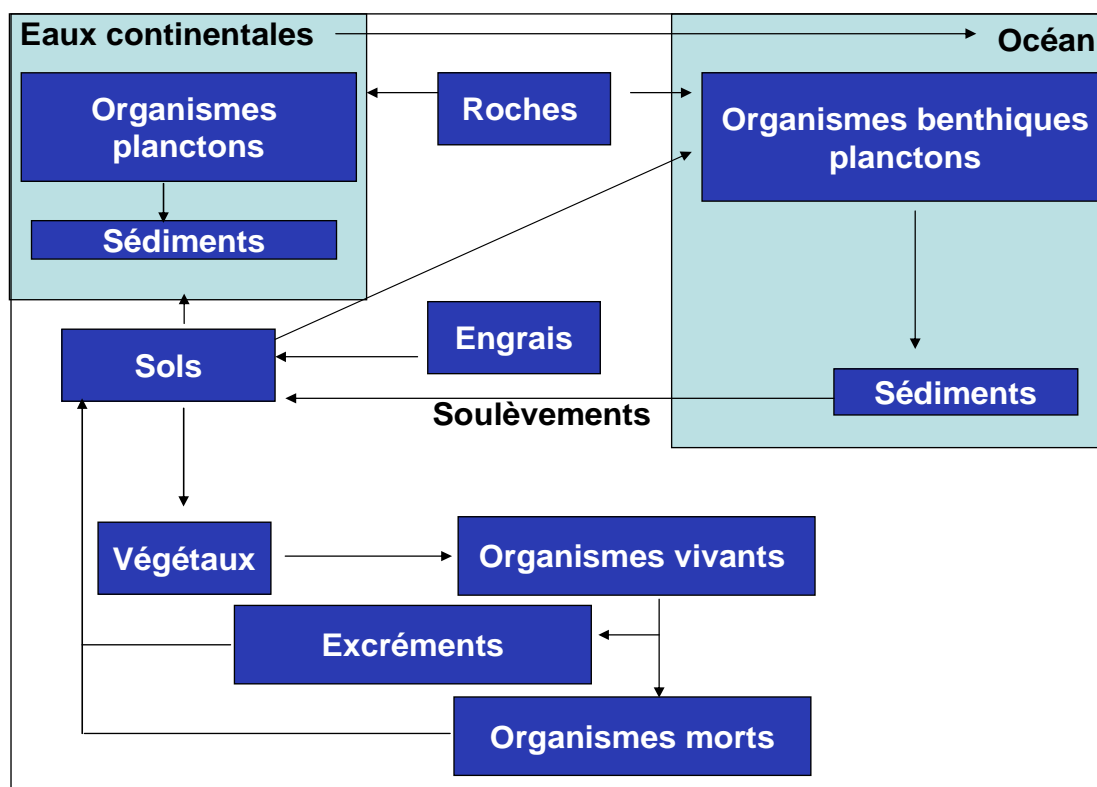


Figure 1: Cycle du phosphore (De Nardi, d'après Sigg *et coll*, 2000)

Le phosphore se trouve dans 5 sources primaires au sein de l'environnement : le sol, les roches, la biosphère, les eaux continentales et les eaux marines. Les processus clés du cycle se résument en quelques étapes :

- L'altération des roches enrichit progressivement le sol en phosphates dont une partie parvient aux eaux souterraines et aux eaux de surface avant d'être amenée jusqu'à la mer.

- Le phosphore, absorbé par les producteurs (végétaux) et incorporé à des molécules biologiques, peut alors être ingéré par les consommateurs.
- Le phosphore retourne dans le sol ou dans les eaux par l'intermédiaire des déjections animales et de la décomposition de la biomasse.
- Une partie est transportée vers les océans où une fraction est utilisée par les organismes benthiques et le plancton alors qu'une autre fraction se dépose au fond de l'océan sous forme d'organismes morts ou de particules pour s'intégrer aux sédiments. Ces derniers sont transformés progressivement en roches sédimentaires par l'enfouissement qui sont ramenées à la surface grâce à la tectonique des plaques avant que le cycle ne recommence.
- Les déplacements faunistiques comme la migration des saumons contribuent de manière importante à la redistribution du phosphore marin (Lodé, 2007)

Bien que le phosphore se trouve en quantités non-négligeables dans la croûte terrestre et soit assez abondant dans les sols, sa mobilité est restreinte du fait de la faible solubilité de ses sels (phosphates de calcium et de Fer (III)) et de sa rétention par les composés du sol (Sigg *et coll*, 2000).

Depuis les années 60, le phosphore est utilisé en grande quantité par l'homme notamment dans les activités agricoles et domestiques (engrais), produits ménagers (lessives, détergents). Cette utilisation de P en quantités croissantes a créé des conditions défavorables dans de nombreux lacs, estuaires et dans les eaux côtières marines. A partir des années 70, les problèmes liés à l'excès de phosphore dans les eaux ont été soulevés. Par la suite, des études ont été conduites afin de connaître l'origine des excès de P et son impact au sein du milieu naturel. Ces dernières ont montré que le P était principalement lié aux activités anthropiques (secteurs agricoles, industriels, Urbanisation).

Deux types de sources à l'origine des excès de P dans les eaux :

- Les sources dites « ponctuelles » qui se définissent par une émission de P qui est indépendante des conditions météorologiques. Elle est fonction des activités anthropiques incluant les activités domestiques (assainissement collectif, individuel), agricoles (fumiers, lisiers, ensilage, rejets des déjections animales), industrielles (rejets d'usines).
- Les sources dites « diffuses » sont liées aux épisodes pluvieux c'est-à-dire que le phosphore est mobilisé par les écoulements superficiels lors des pluies (Dorioz et Aurousseau, 2007). La pollution diffuse est relative aux modes de mise en culture du

sol et à la gestion des exploitations agricoles. L'agriculture intensive est alors une source notable de pollution diffuse notamment par les engrais phosphatés qui sont utilisés pour la croissance des plantes. Cependant, ces engrais utilisés en masse ne sont pas totalement consommés par les végétaux de ce fait, ces derniers restent dans les sols et peuvent être transférés lors d'épisodes pluvieux dans les rivières et les lacs.

Le tableau 2 résume les principales origines du phosphore dans les eaux.

Tableau 2 : Principales origines du phosphore présent dans les eaux classées par activités et selon le mode de rejet (Neveu et coll, 2001)

| Activités | Phosphore d'origine ponctuelle | Phosphore d'origine diffuse |
|--------------------|---|--|
| Domestiques | -Tout à l'égout -Rejets de STEP | -Assainissement individuel -Ruissellement urbain |
| Agricoles | -Fuites liées aux stockages (fumier, lisier) -Rejets des activités de transformation | -Ruissellement sur les bâtiments, cours de ferme -Contribution des terres agricoles |
| Industrielles | -Eau usées | -Ruissellement sur les infrastructures |
| Zone « naturelle » | | -Bruit de fond lié à l'altération et à l'érosion |

En France, 71 000 tonnes de P seraient rejetées chaque année dans les eaux superficielles dont 50 % correspondent à des rejets agricoles, 30 % d'origine urbaine et 20 % d'origine industrielle (Pellerin, 2000).

Le tableau 3 montre les différentes sources de P et ses caractéristiques selon le mode de pollution (Neveu *et coll*, 2001).

Tableau 3 : Caractérisation et typologie des sources de phosphore

| | Sources ponctuelles | Sources diffuses |
|---|--|---|
| Mode d'entrée dans le réseau hydrographique | -Rejets localisés indépendants de la pluie -constitue la quasi-totalité des apports en phosphore total lors des étiages | -Emission du P lors des épisodes pluvieux -Transfert du P lors des crues |
| Nature des flux de phosphore | -Très concentrés avec forte proportion de formes solubles | -Très dilués, accompagnés de forts flux d'eau et de MES |
| Exemples types | -Egouts divers | -Bruit de fond « naturel » -Pertes des terres agricoles -Ruissellements urbains |
| Modes d'évaluation | -Prélèvements et analyses aux points de rejets -Enquêtes sur les réseaux d'eaux usées | -Echantillonnage possible seulement à l'échelle « bassin versant élémentaire » |
| Maîtrise | -Collectables et traitables -Possibilité de définir une norme de rejet | -Non collectables -Maîtrise liée à la gestion du territoire -Pas de norme de rejet possible |

I.1.2/ Les différentes formes du phosphore dans les eaux

Le P est largement répandu dans la nature. Il est souvent lié à l'oxygène pour former des ions phosphates (orthophosphates). L'ion phosphate est un anion polyatomique de formule chimique PO_4^{3-} . Lorsque le pH des eaux de surface diminue, les ions phosphates sont capables de capter des protons comme le montre le diagramme de prédominance de la Figure 2.

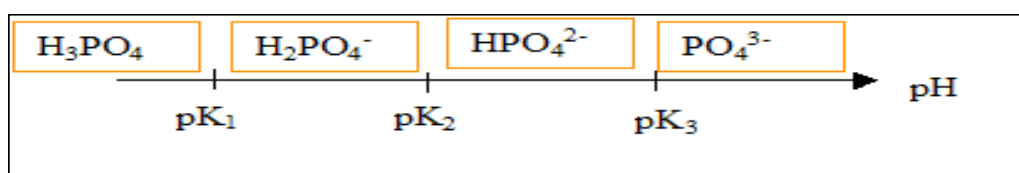


Figure 2 : Diagramme de prédominance des formes du phosphore dans les eaux
(pK₁ : 2,1 ; pK₂ : 7,2 ; pK₃ : 12,5)

Cette dernière met en évidence le caractère amphotère du P non hydrolysable selon le pH de l'eau. Dans les eaux naturelles proches de la neutralité, il est plutôt sous les formes HPO_4^{2-} et H_2PO_4^- .

Le P est également retrouvé sous forme d'ions polymériques hydrolysables (diphosphates, triphosphates) ou associé à des composés calciques (lessives, détergents, apatite), ferriques (strengite), lié à l'aluminium (variscite) ou aux argiles.

Dans les eaux, le P est présent sous forme soluble et particulaire (associé aux particules en suspension). L'ensemble constitue le P total. Le phosphore soluble (ou dissous) est biodisponible en général pour les plantes soit sous forme d'orthophosphates ou bien après l'action d'exo-enzymes. Dans les eaux douces non polluées, sa concentration est inférieure à 15 µg/L. Dans les sols, il est présent en faible quantité soit de 0,04 à 0,1 kg P/ ha sur 30 cm. Le phosphore particulaire comprend des formes minérales (apatite $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$), cristallisées, amorphes et des formes organiques (microorganismes et colloïdes). Il peut aussi être biodisponible mais cela va dépendre du support minéral. En effet, il est composé du P mobilisable (adsorption-désorption de la phase solide du sol) et du phosphore immobilisé dans les argiles, les structures cristallines. Le P étant un facteur limitant dans les eaux de surface, son excès induit durant les périodes de réchauffement des eaux (début printemps, été, automne) des blooms de cyanobactéries accompagné très souvent de production de toxines (Levi, 2007).

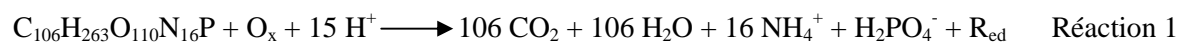
I.1.3/ Conséquences des excès de phosphore dans les retenus

I.1.3.1/ Processus d'eutrophisation et de prolifération de cyanobactéries

L'eutrophisation est un processus d'enrichissement de l'eau (douce ou salée) par les éléments azotés et **phosphorés** favorisant une croissance accrue des végétaux supérieurs, des algues (chlorophycées, pyrrophytes), des diatomées et des cyanobactéries. Par la suite, le milieu s'appauvrit en oxygène, lorsque la respiration des organismes vivants et la décomposition deviennent des processus majeurs par rapport à la production d'oxygène par photosynthèse. Le milieu aquatique devient anoxique. Ce phénomène peut être amplifié par la multiplication de macrophytes flottant comme les lentilles d'eau qui par auto-ombrage, limite la pénétration de la lumière dans l'eau. Ce processus est défavorable aux développements des diatomées et des chlorophycées. La biomasse (algues, cyanobactéries) est décomposée par les microorganismes (bactéries) à l'interface eau-sédiments mettant en œuvre la réaction suivante où O_x et R_{ed} désignent l'oxydant et le réducteur. L' O_2 , les ions NO_3^- , le Mn IV, le Fe III, les SO_4^{2-} , les composés organiques et le CO_2 servent successivement d'oxydants. Lorsque

l'un des oxydants est consommé, le suivant est utilisé. Les réducteurs ainsi obtenus lors de ce processus sont le N_2 , le NH_4^+ , le Mn II, le Fe II, le HS^- et le CH_4 .

La décomposition de la biomasse (algues et cyanobactéries) par les microorganismes s'écrit selon l'équation ci-dessous (Sigg *et coll.*, 2000).



Par diffusion à partir de l'interface eau-sédiments, ces espèces réduites apparaissent dans la colonne d'eau d'un lac. Les apports en nutriments, ainsi que le brassage des lacs jouent un rôle déterminant sur les réactions d'oxydo-réduction au sein d'un milieu.

Les rejets de P en excès dans les eaux peuvent être très néfastes pour les écosystèmes aquatiques puisqu'il s'agit d'un facteur important dans le développement des cyanobactéries. Ces microorganismes sont des procaryotes photosynthétiques comportant près de 2000 espèces pour 150 genres environ. Les cyanobactéries les plus connues en France sont les genres *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktotrix*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Limnothrix*. Ces microorganismes peuvent constituer des blooms (proliférations massives) colorant les eaux (vert, rouge) dont la couleur va dépendre des pigments synthétisés. Il apparaît aussi des nuisances olfactives qui sont liées à la décomposition des cyanobactéries. Pour le traitement des eaux brutes destinées à la consommation humaine, des problèmes lors des étapes de coagulations et des cycles de filtration sont rencontrés.

I.1.3.2/ Les toxines

En période de blooms de cyanobactéries, les concentrations de cellules peuvent atteindre plusieurs milliards par litre et produire des toxines (microcystines LR). Ces dernières sont libérées lors de la lyse des cellules. Parmi les plus connues, les hépatotoxines à potentiel cancérigène, les neurotoxines et les cytotoxines engendrent de sérieux problèmes chez les hommes et les animaux après ingestion ou contact. En effet, la présence de ces molécules dans les eaux brutes est à l'origine d'intoxications humaines (gastro-entérites, troubles digestifs, irritation cutanéomuqueuse, etc). Des réactions allergiques peuvent avoir lieu par simple contact avec les cyanotoxines notamment des éruptions cutanées, des oedèmes, des irritations de la peau... (Bouaicha, 2001 ; Levi, 2006). Après l'absorption

d'hépatotoxines par ingestion accidentelle d'eau contaminée, des maux de têtes et des troubles intestinaux (vomissements, diarrhée, gastro-entérite) peuvent apparaître. La dose admissible journalière (DJA) chez les humains est de 0,04 µg/kg. Cette dernière constitue une valeur seuil pour laquelle aucune lésion aiguë du foie n'a été observée sur une étude durant 13 semaines sur des souris. Cependant, une oncogénèse hépatique a été observée sur des rats à des doses plus faibles que la dose seuil (Charbonneau, 2006). La Figure 3 représente une structure moléculaire générale des microcystines.

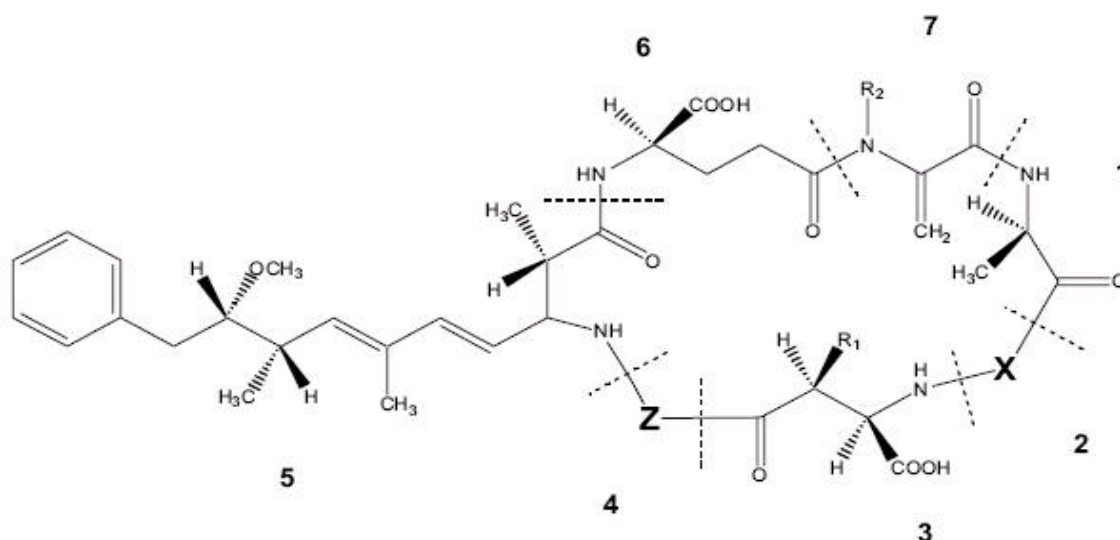


Figure 3 : Structure moléculaire générale des microcystines (Web 4)

Squelette de la microcystine : 1, D-Alanine ; 2, X (variable); 3, D-MeAsp -méthyl-D-acide aspartique) ; 4, Z (variable); 5, Adda (acideβ(D-érythro- (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-méthoxy-2-6-8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque) ; 6, D-glutamate; 7, Mdha (N-méthyl-déhydroalanine). R1 et R2 sont H (déméthylmicrocystines) ou CH₃².

Les variantes proviennent majoritairement de substitution d'acide aminé en position 2 et 4 ou bien du retrait/ajout d'un groupement méthyle sur les fonctionnalités 3 et 7. Les acides aminés les plus communs à la position X sont la leucine (L), l'arginine (R) et la tyrosine (Y), alors qu'à la position Z on retrouve généralement l'arginine (R), l'alanine (A) et la méthionine (M).

Afin de limiter le développement des cyanobactéries et la production de microcystines, des moyens de lutte contre les excès de P dans les eaux ont été étudiés depuis les années 80 avant d'être mis en vigueur. Ces moyens consistent d'une part à minimiser les apports à la source : les moyens préventifs et d'autre part à traiter les excès de P dans l'environnement (sols, eaux) : les moyens curatifs.

I.1.4/ Les stratégies actuelles de réduction du phosphore

I.1.4.1/ Les moyens préventifs

En agriculture, des démarches de réduction des apports de fertilisants sont mises en place en fonction des types et des besoins précis des cultures. De plus, une meilleure connaissance des sols et de la rétention des phosphates par ces derniers sont à prendre en compte.

Le décret du 29 mars 2007 a interdit l'utilisation des lessives domestiques contenant des phosphates (application du décret le 1^{er} juillet 2007). Les effets attendus sont une baisse d'environ 20 % de la charge en P au niveau des STEP et de réduire par conséquent, les apports dans l'environnement et dans le réseau hydrographique ainsi que le coût de traitement de l'eau destinée à la consommation humaine.

La diminution des composés phosphorés dans l'alimentation animale réduirait les rejets de phosphore dans les excréments. Tout le phosphore ingéré n'est pas absorbé par les animaux. En effet, près de $\frac{3}{4}$ du P est excrété puis retrouvé dans les sols. Des méthodes existent pour réduire la teneur en phosphore qui n'est pas assimilé lors de la digestion animale notamment par l'ajout de phytases dans le blé ou le seigle qui augmente la digestibilité de ce dernier. Cette enzyme digère les phytates (formes du P dans les végétaux). Ainsi, une réduction de près de 20 % des rejets de P par animal est observée.

I.1.4.2/ Les moyens curatifs

Il existe à ce jour quelques moyens pour éliminer le phosphore : les procédés physico-chimiques et biologiques pour les eaux usées. Il est possible d'éliminer le phosphore par précipitation chimique qui peut s'effectuer à l'aide de sels de fer (chlorure ferrique), d'aluminium (sulfate d'aluminium) ou de chaux. D'autres techniques de cristallisation et d'adsorption sur lits contenant du fer ou de l'aluminium sont également mises en œuvre.

Les procédés biologiques comme les procédés de boues activées permettent d'éliminer le P en excès. Son élimination s'effectue par la croissance d'algues, de macrophytes flottants (Lentilles d'eau) ou d'hélophytes (Phragmites, baldingères) et des bactéries. Le phosphore contenu dans les eaux usées est incorporé dans la biomasse. Pour une boue activée, la déphosphatation biologique peut décrire l'élimination du P par une biomasse microbienne au-delà de ses besoins de croissance. Les bactéries déphosphatantes sont hétérotrophes et aérobies. Parmi elles, l'espèce *Pseudomonas putida* GM6 permet d'éliminer jusqu'à 96 % du P en 21 jours (P résiduel : 0,2 mg/L). Cette espèce permet ainsi la déphosphatation biologique

à partir d'eaux usées (Cai *et coll*, 2007). L'espèce *Accumulibacter phosphovor*, le genre *Pseudomonas* et *Tetrasphaera* intervient également dans l'élimination du phosphore au sein de stations d'épuration (Günther *et coll*, 2009). La déphosphatation biologique nécessite 2 étapes comme le met en évidence la Figure 4 qui montre le principe d'élimination du P par les bactéries déphosphatantes.

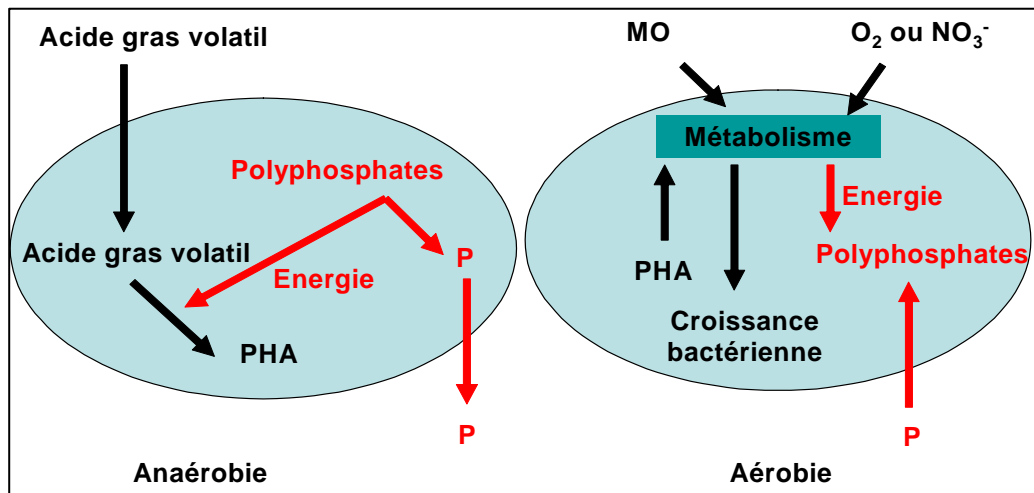


Figure 4 : Principe de l'élimination du P par les bactéries déphosphatantes

En condition anaérobie, les bactéries déphosphatantes vont produire des polyhydroxyalcanoates (PHA) à partir d'acides gras volatils. Pour le stockage des PHA, l'énergie est apportée par le P stocké sous forme de granules de polyphosphates intracellulaires. En condition aérobie, les PHA sont consommés par les bactéries, ce qui permet de reconstituer leur stock de polyphosphates et de se multiplier. L'accumulation des phosphates permet de former des réserves d'énergie utilisables dans les conditions d'anaérobiose. L'élimination biologique du phosphore est liée à une plus importante réabsorption par rapport au relargage. Les bactéries ayant assimilées le P sont purgées du système. Ce procédé nécessite parfois de prévoir en complément une déphosphatation chimique par précipitation pour obtenir le taux minimal de P attendu. Ces procédés sont onéreux et posent des problèmes de gestion dans l'élimination des boues générées, notamment lors de leur incinération (Comeau, 1997).

D'autres procédés sont mis en œuvre comme le traitement des lisiers agricoles. Lorsque les éleveurs produisent plus de 25 000 unités d'azote, le P est alors aussi pris en considération pour le traitement. Le P est extrait par séparation de phase (tamis statique), par

centrifugation ou par décantation (floculation, coagulation). A ce jour, il n'y a pas de normes au niveau de l'épandage d'effluents à l'exception de la Vendée, où le règlement sanitaire départemental indique que les apports de phosphore ne doivent pas excéder un plafond d'épandage de $100 \text{ kg.ha}^{-1}.\text{an}^{-1}$. L'enrichissement des parcelles en phosphore issu de l'agriculture est encore difficile à maîtriser.

Les procédés utilisant l'oxygénation dans la couche d'eau la plus profonde, a pour but d'empêcher le relargage du phosphore par les sédiments. Le curage des sédiments et la récolte de la biomasse ont permis une amélioration de la qualité des eaux même si ces procédés sont coûteux. D'autant plus, qu'il est nécessaire de trouver une issue pour les matières enlevées.

I.1.4.3/ Amélioration de la qualité de l'eau

I.1.4.3.1/ Cas du lac Léman (Suisse)

Le lac Léman est l'une des plus grandes réserves d'eau d'Europe occidentale d'où l'intérêt de préserver cette ressource afin de produire de l'eau destinée à la consommation humaine (EdCH) en abondance et de très bonne qualité via des moyens de traitement simples (CIPEL, 2006). Un plan de gestion de 2000 à 2010 a été mis en place dans le but de produire de l'EdCH. La consommation domestique s'élève en moyenne à $170 \text{ L.j}^{-1}.\text{hab}^{-1}$, et s'élève aux alentours de 500L en tenant compte de l'agriculture, de l'industrie et des services. Cette ressource est soumise à des excès de phosphore depuis les années 60 de ce fait, des actions ont été mises en œuvre pour diminuer leurs concentrations dans le lac Léman. La Figure 5 indique l'évolution de la concentration moyenne pondérée en phosphore total contenu dans le lac depuis les années 50 jusqu'en 1994 (Blanc *et coll*, 1999 ; Sigg *et coll*, 2000).

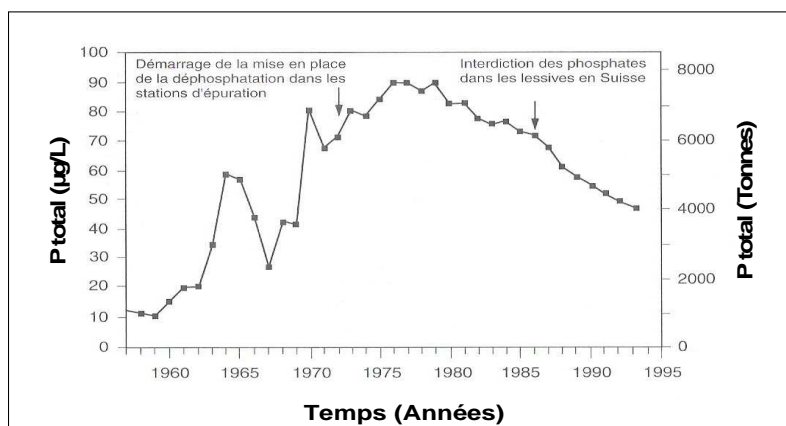


Figure 5 : Evolution de la concentration moyenne pondérée de phosphore total, contenu dans le lac Léman (Blanc *et coll*, 1999 ; Sigg *et coll*, 2000).

Depuis les années 80, le phosphore est en nette régression dans le lac. Pour cela, la mise en place de processus de déphosphatation au sein des stations d'épuration responsables de l'apport en P, a été nécessaire. Néanmoins, une diminution jusqu'à 30% du taux de phosphore total a été mise en évidence une dizaine d'années plus tard. Par la suite, l'interdiction des phosphates dans les lessives a fortement contribué à une chute du phosphore total à partir de 1986. L'objectif du CIPEL est d'abaisser les concentrations de P en mettant l'accent sur l'action à la source. Elle recommande la mise à disposition et l'utilisation des produits détergents sans phosphates pour lave-vaisselle ou à teneur réduite de P avec des indications précises pour les consommateurs.

I.1.4.3.2/ Cas du lac de Ribou à Cholet (Maine-et-Loire, France)

Le lac de Ribou constitue une ressource indispensable pour produire de l'eau destinée à la consommation humaine alimentant environ 60 000 habitants à Cholet et dans son agglomération. Cependant, l'agriculture intensive (élevages, cultures), les stations d'épuration, l'assainissement autonome, le ruissellement urbain et les rejets industriels sont responsables d'un apport conséquent de phosphore au sein de cette retenue d'eau par le biais du bassin versant de Ribou. La Figure 6 montre la qualité de l'eau vis-à-vis du P sur les différentes stations du BV du Ribou pendant l'année 2006 (moyenne annuelle de la concentration en P). Un code de couleur est attribué pour classer les eaux à l'échelle du bassin versant en termes de qualité (bonne ou oligotrophe en vert, médiocre ou eutrophe en orange...). Chaque couleur correspond à une fourchette de concentration en P qui est différente selon une eau de retenue ou d'une eau de rivière (ex : pour une eau de qualité passable, les concentrations en P sont comprises entre 0,2 et 0,5 mg/L dans les ruisseaux et de 0,025 à 0,08 mg/L pour les retenues d'eau).

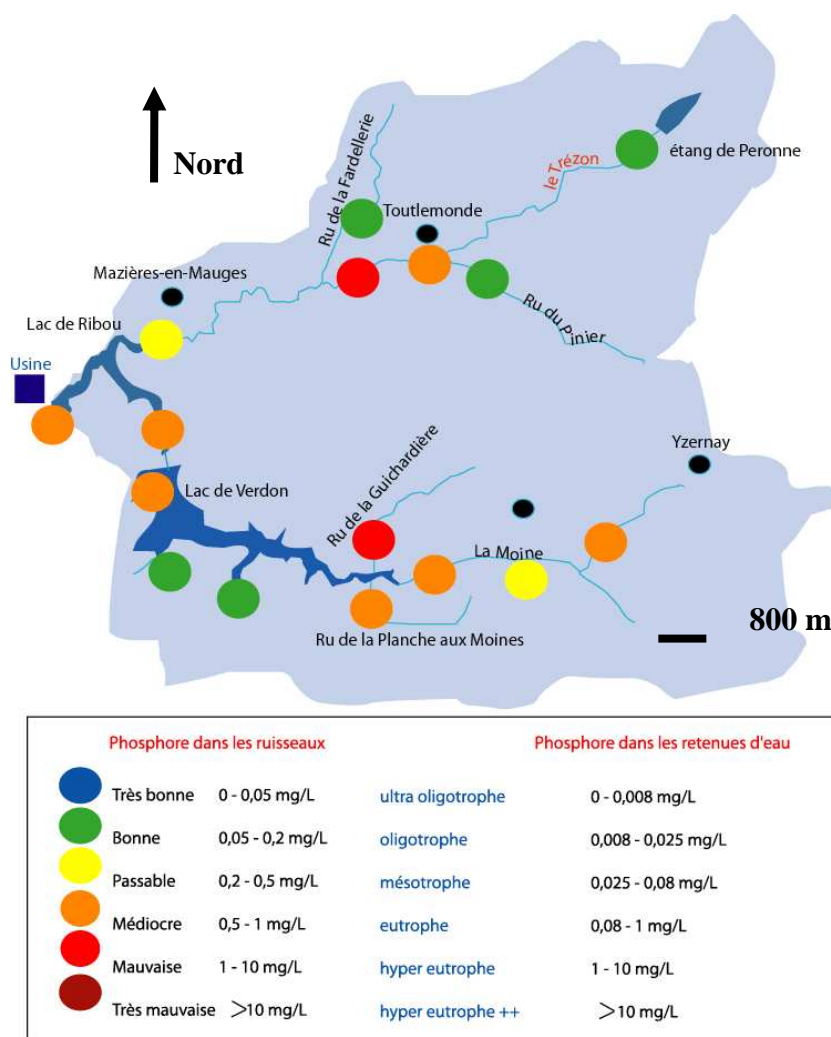


Figure 6 : Suivi de la qualité de l'eau au sein du bassin versant de Ribou. Conception : De Nardi Frédéric (D'après CAC, 2007)

Le suivi qualitatif des eaux de Ribou durant la campagne 2006 a montré que les eaux sont de mauvaises qualités à proximité des stations d'épuration qui sont toutes dépourvues de traitement de déphosphatation (Ru de la Guichardière ; Aval de Toutlemonde). De plus, l'eau du lac de Ribou à proximité de l'usine de production d'eau destinée à la consommation humaine (Figure 6, carré bleu) est plutôt de nature eutrophe avec une moyenne annuelle des concentrations mensuelles de P se situant entre 0,08 et 1 mg/L.

Pour sortir de l'eutrophisation, les apports annuels de P doivent être diminués d'un facteur 10 soit des concentrations atteignant environ 0,03 mg/L dans les rivières. C'est la

raison pour laquelle une trentaine d'actions sont mises en œuvre pour améliorer la qualité des eaux du lac de Ribou et de son bassin versant. Ces actions s'insèrent dans un plan de gestion 2006-2010 qui constitue un outil incitatif pour restaurer une bonne qualité de l'eau. Certaines de ces actions sont rapportées par la suite, elles consistent à :

- Améliorer certaines pratiques agricoles par l'engagement dans des contrats agri-environnementaux,
- Mettre aux normes des bâtiments d'élevages,
- Freiner les flux de pollution, en limitant et traitant les ruissellements urbains,
- Favoriser l'implantation de haies, de bandes enherbées, de prairies. En effet, des données récentes ont montré qu'un enherbement de 2 ans de 7,5 m de large retenant jusqu'à 71 % de P total, qu'une parcelle de sorgho de 7,5 m pouvaient retenir 48 % du P total et qu'une prairie de 25 ans (7,5 m) réduisaient jusqu'à 71 % du P total (Dorioz *et coll*, 2006).
- Diminuer les rejets industriels et artisanaux,
- Améliorer les assainissements non collectifs en réhabilitant les installations non conformes et en optimisant les stations d'épuration et les réseaux d'eaux usées,
- Améliorer également les techniques de culture en réalisant des plans de fumure, des inter-cultures pour limiter les apports polluants,
- Préserver la qualité des milieux aquatiques par la réhabilitation de zones humides, par l'arrachage de plantes envahissantes et par l'entretien de la végétation sur les rives. Néanmoins, durant leur décomposition, les végétaux contribuent à l'apport de MO dans les eaux.

Actuellement, au niveau européen, un partage des expériences nationales existe à travers un réseau : le COST Phosphore. Il s'attelle à l'analyse des méthodes d'atténuation qui sont distinctes des méthodes préventives et curatives. La réduction des apports et des bilans dans les parcelles sur les bassins versants constitue un exemple de méthodes préventives. L'évacuation de vases enrichies en P et le traitement des cyanobactéries sont des méthodes curatives. La mise en place d'une zone tampon qui constitue un moyen efficace à court terme pour maîtriser la contamination du réseau hydrographique par les transferts du phosphore dans les eaux de surface, est une méthode d'atténuation. Actuellement, les efforts se concentrent sur la mise au point et l'optimisation de ces méthodes d'atténuation (Dorioz et Aurousseau, 2007)

I.2/ La matière organique dans les eaux naturelles

I.2.1/ Origines et caractéristiques de la MO

Le cycle du carbone présenté sur la Figure 7 est basé sur les interactions entre l'atmosphère, le lac et les sédiments. La formation de MO lors de la photosynthèse, dans laquelle les éléments nutritifs sont incorporés (phosphore, azote), ainsi que la minéralisation de la MO sont primordiales. Le CO se forme lors de la photosynthèse avec production du phytoplancton. Dans les lacs, la production primaire est d'environ de 50 à 1000 mg de C.m⁻².j⁻¹, et pouvant atteindre quelques grammes de MO.m⁻².j⁻¹. Cette production primaire constitue le premier maillon de la chaîne alimentaire. En plus de la minéralisation du carbone organique en carbone inorganique, des produits intermédiaires comme les substances humiques et fulviques apparaissent. Ces derniers sont des produits de ces réactions de décomposition, ainsi que des réactions naturelles de polymérisation. Ces composés sont dissous dans les eaux. La MO qui n'est pas complètement décomposée apparaît comme détritiques ou adsorbée sur des particules minérales. Celle issue du lessivage des sols et des eaux usées représente également une part du COD et du COT. La MO peut sédimenter sous forme particulaire et s'intégrer dans les sédiments où les processus de minéralisation se poursuivent. Après consommation de l'oxygène, les microorganismes utilisent les différents oxydants selon leur potentiel rédox jusqu'à la méthanisation qui correspond au produit final (Sigg *et coll*, 2000).

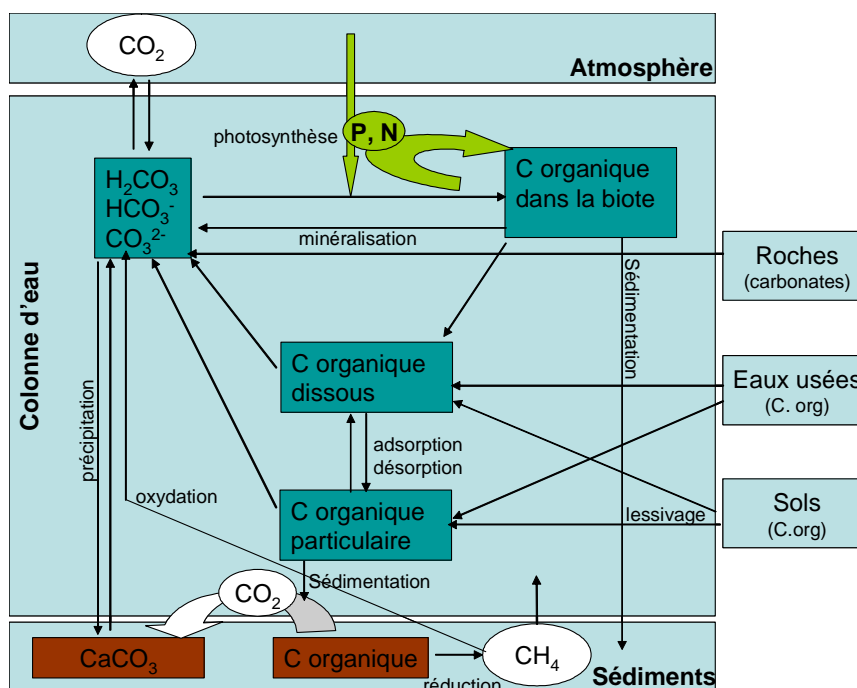


Figure 7: Cycle du carbone dans les eaux naturelles (D'après Sigg *et coll*, 2000)

Selon le type d'eau, les concentrations en MO sont très différentes. Le tableau 4 indique les concentrations en carbone organique dissous (COD) et particulaires (COP) retrouvées dans les différentes eaux naturelles.

Tableau 4 : Concentrations usuelles du CO sous les formes COD et COP rencontrées dans les eaux (Sigg *et coll*, 2000)

| Eaux | COD (mg/L) | COP (mg/L) |
|--|-------------|------------|
| Mer/Océan | 0,5 | 0,05 |
| Eau souterraine | 0,5 - 1,5 | |
| Eau de pluie | 0,5 - 2,5 | |
| Eau de rivière | 1,0 - 10,0 | 1,0 - 2,0 |
| Lac eutrophe | 2,0 - 10,0 | 2,0 - 3,0 |
| Marécage | 10,0 - 50,0 | 2,0 - 3,0 |
| Eau interstitielle des sédiments ou des sols | 2,0 - 50,0 | |

La matière organique naturelle provient de la dégradation des débris de végétaux à la surface du sol par les microorganismes (Rumpel, 2002). Les matériaux apportés par les végétaux sont principalement des tissus végétaux comme la lignine, des polysaccharides (cellulose), des polyphénols (tannins) et des lipides. Les constituants cellulaires sont également retrouvés et plus rapidement biodégradés tels que les protéines, la chlorophylle et autres pigments. Certains constituants cellulaires sont apportés majoritairement par les microorganismes comme les peptidoglycanes des parois bactériennes et les pigments de certains champignons (les mélanins qui sont considérés comme des précurseurs potentiels de substances humiques). Les bactéries et les champignons du sol métabolisent la lignine, la cellulose, les polysaccharides et les composés organiques simples tels que les sucres, les acides aminés, les acides gras. Les produits, les sous-produits de la fraction réfractaire à cette décomposition constituent le profil en MO du sol. Il existe deux phénomènes de dégradation de la MO brute. Le phénomène le plus rapide consiste en la transformation de la MO facilement biodégradable en matières minérales. Le processus le plus lent est appelé l'humification (transformation de la MO brute en humus). Ce dernier procédé enrichit le sol en MO transformée car les substances humiques ainsi formées sont lentement biodégradables (Gauthier, 2003).

I.2.2/ Les substances humiques

Les substances humiques sont définies comme des composés organiques présents dans les sols, les sédiments, les eaux ou synthétisés à partir de matières organiques fermentescibles. La Figure 8 montre la voie de formation des substances humiques.

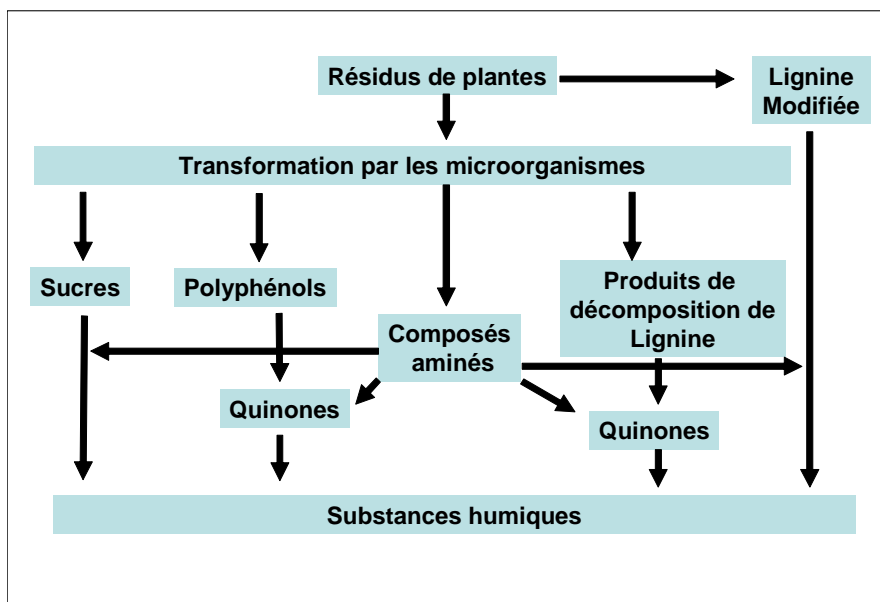


Figure 8 : Voie de formation des substances humiques (D'après Stevenson 1982, cité par Amir, 2005)

Il s'agit de macromolécules de masse moléculaire élevée (> 40 kDa). Elles comprennent une grande variété de groupements fonctionnels qui leur confèrent une charge globale négative (carboxyles, hydroxyles, phénols). Par conséquent, elles se trouvent dans de nombreux cas sous formes de sels. Les substances humiques (SH) peuvent complexer des cations métalliques (Al^{3+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ...), ce qui leur confère des propriétés de molécules échangeuses d'ions suivant les conditions du milieu (Duchaufour, 2001). Les SH sont dans ce cas considérées comme des « supramolécules », constituées de petites molécules (dérivées de la dégradation de la matière organique) liées entre elles par des liaisons de faible énergie (Piccolo, 2001, Martin, 1995). Les composés organiques difficilement dissociables se transforment en substances humiques par polymérisation et par association avec des substances azotées. Les microorganismes du sol sont responsables non seulement de la synthèse, mais aussi de l'élimination des SH. De nombreux microorganismes aérobies vivant dans le sol utilisent l'énergie contenue dans ces substances. Après oxydation, ces SH sont consommées. Les substances humiques sont dégradées d'autant plus rapidement que leur poids moléculaire est faible (Web 5).

Les substances humiques peuvent avoir des origines très diverses : dérivés de charbon, lignine, léonardite, ou toute matière organique d'origine animale, végétale ou bactérienne. Elles comprennent :

- **les acides humiques** (solubles en milieu alcalin et insolubles en milieu acide) sont des polymères à hauts poids moléculaire à caractère aromatique, chargés négativement, de couleur noire à brun foncé, résultant d'un processus de condensation oxydative des composés phénoliques et liés à des acides aminés, des peptides et des polysaccharides. Ils sont riches en carbone et moins riches en oxygène (cité par Tissaux, 1996).
- **les humines** (insolubles à tout pH) ressemblent beaucoup aux acides humiques mais diffèrent seulement par le fait qu'elles se trouvent en association très étroite avec les matériaux inorganiques. Les humines correspondent à la partie non-extractible de la fraction humifiée (Tissaux, 1996).
- **les acides fulviques** (solubles en milieu alcalin et en milieu acide) possèdent un taux de carbone relativement faible. L'oxygène, présent sous forme de groupes fonctionnels responsables d'une activité élevée, est abondant. Ils sont formés de composés phénoliques à faible poids moléculaire, liés à des polysaccharides. Les acides fulviques seraient considérés à la fois comme précurseurs et produits des acides humiques (Tissaux, 1996). De plus, certaines substances humiques sont naturellement hydrosolubles, dans ce cas le pourcentage d'acides humiques est relativement faible (Web 6). Les SH représentent une part importante du COD, selon Leenheer, les acides fulviques représentent 45 % du COD des eaux de surface et les acides humiques, 5 % du COD (Figure 9). La part des autres fractions (hydrophiles) est également représentée sur la Figure 9.

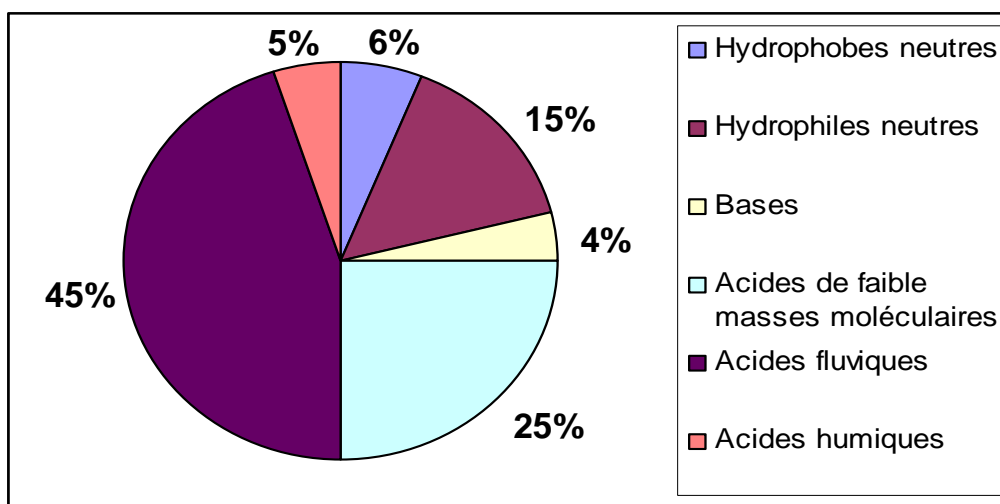


Figure 9 : Répartition des fractions du COD des eaux de surface selon Leenheer (1981)

En 1981, Leenheer écrit que les hydrophiles neutres sont représentés par des structures carbonylées et des hydrocarbures. Leur spectre infrarouge étant similaire à celui des polysaccharides, alors que les hydrophiles basiques s'apparenteraient à des dérivés de protéines. Les acides hydrophiles qui

correspondent à la fraction majoritaire des fractions hydrophiles, engloberaient des acides polycarboxyliques et hydroxyacides.

I.2.3/ biodégradabilité

La biodégradabilité représente l'utilisation effective de la MO par les microorganismes et traduit l'expression mesurable du potentiel d'interaction. La biodégradabilité englobe deux processus, d'une part l'utilisation microbienne directe ou après décomposition de composés pour la biosynthèse de nouveau matériel cellulaire et d'autre part la minéralisation pour obtenir de l'énergie et des nutriments inorganiques. La connaissance de la bioréactivité est essentielle pour évaluer la persistance de la MO dans un milieu et extrapoler son devenir. La bioréactivité est surtout quantifiée par des mesures de biodégradabilité bien que ces mesures ne représentent parfois qu'une infime part du potentiel total.

La biodégradation est déterminée par l'augmentation de la biomasse où seul le carbone organique assimilable (COA) est considéré et la matière organique minéralisée est négligée.

La MO labile est principalement constituée de composés simples qui sont utilisés directement par un grand nombre de microorganismes sans le recours à des enzymes spécifiques (sucres simples, acides organiques courts, acides aminés, petites protéines).

La MO lentement dégradable et relativement stable contenant des composés qui nécessitent des enzymes spéciales de décomposition, essentiellement produites : (i) soit par quelques microorganismes moins intéressés par des substrats labiles, (ii) soit par des microorganismes en manque de substrats labiles (polysaccharides, dérivés de plantes...).

La MO récalcitrante (ou réfractaire) étant peu biodégradable, s'accumule dans le milieu. Cette fraction consiste en des structures qui ne sont pas facilement rompues par des enzymes, comme des dérivés de lignine ou des composés fortement altérés (Labanowski, 2004).

Les matières biodégradables sont généralement considérées comme simples et de petites tailles alors que les molécules complexes comme les substances humiques (incluant les substances transphiliques) paraissent réfractaires au processus de biodégradation. Cependant, ce concept est à modérer puisque des composés de petites et de grandes tailles apparaissent biodégradables. En effet, les substances humiques peuvent être partiellement dégradées lors de réactions enzymatiques et utilisées par les bactéries.

Les bactéries principalement retrouvées dans les eaux naturelles appartiennent aux familles suivantes :

- Les *Enterobacteriaceae*
- Les *Bacillaceae*
- Les *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas fluorescens*)

Selon certains auteurs (Hertkorn *et coll*, 2002), l'espèce *Pseudomonas fluorescens* représente 39 % des bactéries contenues dans les eaux de lacs. Les bactéries retenues pour la détermination du CODB dans le cadre de l'étude conduite par plusieurs auteurs sont *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtilis* car ces microorganismes sont représentatifs des milieux naturels aquatiques. Des résultats obtenus en laboratoire ont permis de mettre en évidence la part de carbone biodégradable pour une eau de surface (rivière). Ces résultats sont assez représentatifs des milieux naturels. En effet, en 1981, Thurman et Malcolm ont montré que pour une eau de surface, les matières organiques biodégradables par ordre décroissant sont les suivantes :

Fractions hydrophiles (HPI) > Fractions transphiliques (TPH) > Fractions hydrophobes (HPO)

En 1999, dans le lac de Ribou, les fractions hydrophobes représentaient 62 %, les transphiliques 24 % et les hydrophiles 14 % (Violleau, 1999).

Le tableau 5 montre le pourcentage de carbone biodégradable sur les différentes fractions isolées d'une eau de surface (la Glane, Haute-vienne).

Tableau 5 : Pourcentage de carbone biodégradable d'une eau de surface (Labanowski, 2004)

| | CODB | | |
|----------------------|-------|--------|--------|
| | HPO | TPH | HPI |
| <i>B.subtilis</i> | 7,00% | 10,00% | 16,00% |
| <i>P.fluorescens</i> | 8% | 12% | 20% |

D'après Thurman et Malcolm, 1981

| | CODB | | |
|----------------------|-----------|-------|-------|
| | HPI + TPH | AF | AH |
| <i>B.subtilis</i> | 17,50% | 7,50% | 7,50% |
| <i>P.fluorescens</i> | 15% | 10% | 9% |

D'après Malcolm et Mac Carthy, 1992

Pour chaque fraction isolée, le CODB est déterminé à l'aide de bactéries retrouvées dans le milieu naturel (*B. subtilis*, *P. fluorescens*). Généralement, dans les eaux naturelles, la part de CODB a été estimée à 20-30 % (Labanowski, 2004).

I.2.4/ Fractionnement de la MO sur résine XAD-4 et XAD-8

Les matières organiques contenues dans les eaux naturelles sont composées de molécules de tailles différentes (Leenhner et Croué, 2003). Les chaînes carbonées aliphatiques ou phénoliques sur lesquelles sont greffées des groupements fonctionnels (amides, cétones, carboxyliques). Les transformations biochimiques des matières organiques et les interactions avec les métaux engendrent des modifications structurales rendant très complexes la caractérisation de la MOD. Actuellement, de nombreuses méthodes d'analyses de la MOD existent pour les concentrer (par exemple par nanofiltration ou osmose inverse) ou les isoler notamment par échange d'ions (Aiken et Leenheer, 1993), par ultrafiltration séquentielle (Aoustin *et coll*, 2001) ou bien par adsorption sur résines macroporeuses non ioniques (XAD). L'adsorption sur ces résines est la méthode la plus utilisée. Les deux types de résines utilisées sont la résine XAD8 (Ester acrylique) pour retenir les MO hydrophobes et les résines XAD4 (Divinylbenzène) pour retenir les MO transphiliques. La Figure 10 montre le protocole d'extraction des MO utilisant les résines XAD (Leenheer, 1981)

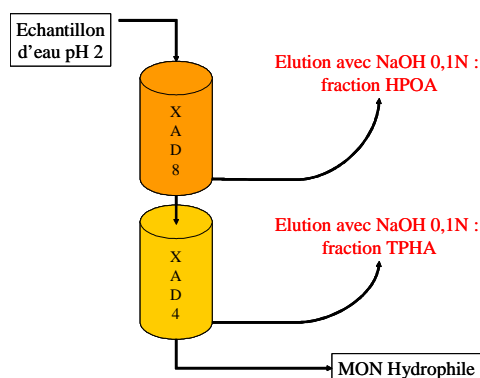


Figure 10 : Protocole d'extraction de la MO

Les acides humiques et fulviques s'adsorbent sur la résine XAD8 lorsque ces molécules sont sous formes protonées par acidification ($\text{pH} = 2$) de la solution filtrée ($< 0,45\mu\text{m}$). L'ajout d'une résine XAD4 en série a permis de retenir des fractions non retenues par les XAD8. Ainsi les fractions retenues par la XAD8 sont nommées HPO (pour hydrophobe) et celles retenues par les XAD4 sont nommées TPH ou TPI (pour transphilique). Une solution de soude à 0,1 N est utilisée pour éluer les MO préalablement retenues sur les résines.

I.2.5/ La problématique MO dans l'eau du lac de Ribou à Cholet

La Figure 11 montre la qualité des eaux vis-à-vis de la MO oxydable au niveau de toutes les stations de prélèvements d'eau.

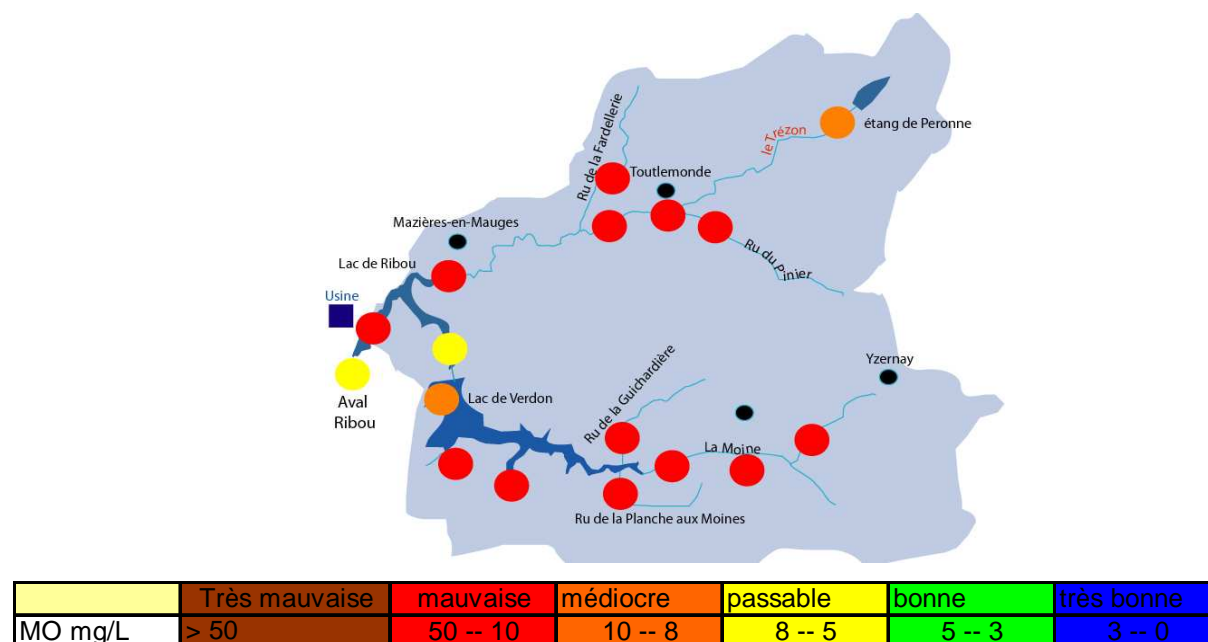


Figure 11 : Qualité des eaux vis-à-vis de la MO (oxydabilité au KMnO_4) sur l'ensemble du bassin versant de Ribou durant l'année 2006

Sur la Figure 11, un code de couleur est attribué pour classer les eaux en terme de qualité (bonne en vert, passable en jaune...) au même titre que pour le P. Chaque couleur correspond à une fourchette de concentration en MO (ex : une eau de qualité mauvaise a des concentrations en MO oxydable comprises entre 50-10 mg/L ; une eau de bonne qualité ne doit pas dépasser 5 mg/L de MO oxydable). Dans ce cas, il s'agit d'un pic maximal de MO oxydable qui a eu lieu au cours de l'année 2006 au sein d'une même station. Les eaux sont classées de mauvaises qualités sur l'ensemble du bassin versant à l'exception des points d'eau situés en aval des deux barrages où la qualité de l'eau est passable. Sur le point en amont du lac de Verdon et en aval de l'étang de Péronne, l'eau est classée de qualité médiocre. 50 % des MO proviennent des activités anthropiques avec majoritairement les élevages (31 %) puis le ruissellement urbain (8,5 %) les STEP (4,5 %), l'assainissement autonome (3,5 %), et les rejets industriels (2,5 %), alors que les autres 50 % proviennent majoritairement de la dégradation du phytoplancton par les bactéries suite aux blooms algaux estivaux.

Les microorganismes présents dans le milieu naturel jouent un rôle dans la dégradation de la MO (cf biodégradabilité).

I.2.6/ Outils analytiques permettant d'étudier la MO

I.2.6.1/ La fluorimétrie 3D

La spectroscopie de fluorescence est utilisée pour la caractérisation des MO dans différents types d'eaux (mers, surface, sols). Cette technique repose sur l'énergie émise par une molécule préalablement excitée qui retourne à son état fondamental (Stedmon *et coll*, 2003). Parmi les différents modes d'acquisition, les matrices d'émission-excitation (MEE) permettent d'obtenir une vue d'ensemble sur les propriétés de fluorescence d'un échantillon préalablement filtré avec des informations plus détaillées sur la composition complexe de la mixture. Les informations sont données en 3 dimensions x, y, z correspondant respectivement à l'axe d'émissions, d'excitations et d'intensités de fluorescence.

Les propriétés de fluorescence sont attribuées aux structures aromatiques (acides humiques) ou aux chaînes aliphatiques riches en insaturations présentant de forts degrés de conjugaison (Chen *et coll*, 2002). De manière générale, deux types de molécules sont classiquement étudiés :

- Les matières humiques qui deviennent fluorescentes dans le bleu
- Les protéines (fluorescent dans l'UV)

Les substances humiques sont composées de deux fluorophores d'origine supposée terrestre qui sont observables pour les MO de toutes origines (eaux de surface, sols, mer) et d'un fluorophore d'origine marine. Plusieurs dénominations sont trouvées dans la littérature mais la plus utilisée a été définie par Coble (1996).

Le tableau 6 montre les fluorophores avec leurs longueurs d'ondes correspondantes.

Tableau 6 : Dénominations des principaux fluorophores selon leur origine

| Classes de fluorophores | Fluorophores/ origines | l.o exc – em moyennes (nm) | Dénominations Coble (1996) |
|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Substances humiques | AH terrestres | 250 - 430 | A |
| | AH et AF terrestres | 340 - 450 | C |
| | SH Marines | 310 - 400 | M |
| Protéines | Tyrosine like | 270 - 310 | B |
| | Tryptophane like | 270 - 340 | T |

Les fluorophores A et C ont été attribués respectivement aux acides fulviques et humiques (Mounier *et coll*, 1999). Cependant, d'autres études ont montré que le fluorophore A était plus intense que le fluorophore C (Croué *et coll*, 1999). Le fluorophore A correspond à la MOD plus hydrophobe que le fluorophore C. La fraction protéinique des MOD floresce dans des gammes de longueurs d'onde plus basse. Les fluorophores B et T ont été attribués à des dérivés de la tyrosine et du tryptophane. Ces derniers sont considérés comme étant des marqueurs de l'activité biologique. Les bandes de fluorescence sont notamment observées dans les échantillons d'eaux usées et eutrophes (Parlanti *et coll*, 2000).

La fluorescence est un outil très intéressant pour étudier les MO terrestres, aquatiques, naturelles ou anthropiques, du fait de sa sensibilité et de sa nature non destructrice (Senesi *et coll*, 1991).

I.2.6.2/ Le couplage : Pyrolyse/ chromatographie en phase gazeuse/ détection de masse

Le couplage est utilisé depuis plusieurs années en géochimie organique et en science des sols et plus récemment pour l'étude des MOD (Bruchet, 1985 ; Saiz-jimenez, 1994 ; Widrig *et coll*, 1996 ; Vancampenhout *et coll*, 2009). Cette technique qui est basée sur la dégradation thermique des échantillons, engendre des réarrangements au niveau de certaines liaisons moléculaires avec des fragments pouvant rester intacts (composés aromatiques). Les composés sont alors séparés par chromatographie en phase gazeuse puis détectés par spectrométrie de masse.

En 1990, Bruchet *et coll* ont attribué certains fragments de pyrolyse à des biopolymères comme le montre le Tableau 7.

Tableau 7 : Origines et fragments de pyrolyse caractéristiques des principaux biopolymères (Bruchet *et coll*, 1990 ; Leenheer et Croué, 2003 ; Demeusy, 2007)

| Biopolymères | Origines | Fragments de pyrolyse caractéristiques |
|-------------------------------------|---|--|
| Polysaccharides (amidon, cellulose) | Aquagénique : algues et bactéries Pédogénique : résidus de plantes | Unités d'hexoses et de pentoses : furfural, furanne, lévoglucocénose |
| Protéines | Aquagénique : algues et phytoplancton | Pyridines, Pyrroles, indoles, nitriles Tyrosine : phénol et p-crésol (même quantité) Phénylalanine : toluène, styrène, phénylacétonitrile Tryptophane : indole |
| Aminosucres | Parois cellulaires bactériennes et fongiques | Acétamides |
| Polyhydroxyaromatiques | Plantes : lignine Aquatique : algues, diatomées, animaux | Composés phénoliques Lignine : méthoxyphénols, o-phénol |
| Tanins | Pédogénique : plantes supérieures | Catéchols, m-phénols |

Le tableau 7 montre que les fragments de pyrolyses de types hexoses et pentoses sont attribués aux polysaccharides pouvant provenir des algues, des bactéries ou des plantes. Les composés aromatiques de types indoles, pyrroles, pyridines seraient issus de protéines dont l'origine est aquagénique. Les fragments d'acétamides proviennent de la dégradation d'aminosucres (parois bactériennes et fongiques). Les méthoxyphénols et les o-phénols sont des produits de pyrolyse issus de la lignine et la présence de Catéchols et de m-phénols sont attribués aux tanins (plantes supérieures). Actuellement, les processus mis en jeu lors de la pyrolyse restent inconnus. En raison de la complexité des MO issus des eaux de surface, Il est souvent difficile de bien interpréter les chromatogrammes. Cependant, certains auteurs utilisent la pyrolyse CG-SM pour caractériser la MOD préalablement extraite des eaux sur résines XAD (Croué, 2001 ; Demeusy, 2007). De plus, un auteur (Croué, 2001) a montré que les résultats de pyrolyse CG-SM étaient bien en accord avec les résultats déterminés par RMN-C¹³.

I.2.5.3/ L'analyse par composante principale (ACP)

L'analyse par composante principale (ACP) est une technique de description statistique utilisant les moindres carrés et conduisant à des représentations graphiques à partir d'un ensemble de données numériques. Les données d'un tableau comprenant n individus à p caractères forment un nuage de points dans un espace à p dimensions. La visualisation des données dans un espace à 2 dimensions nécessite une projection des points sur un plan tout en limitant la perte de l'information en maximisant la dispersion des individus. Ce plan est défini en 2 axes appelés composantes principales construites par combinaison linéaire des variables initiales. La première composante est déterminée de telle sorte à obtenir une variance maximale de n individus étudiés. La deuxième composante correspond à un axe orthogonal à la première composante ayant la deuxième plus grande variance et l'information complémentaire non expliquée par la première composante.

Il existe un certain nombre de composantes allant de la première à la $k^{\text{ème}}$ composante avec des parts d'information expliquées par chacune d'elles devenant de plus en plus faibles. Généralement, un nombre restreint de composantes (2 à 5) suffit à expliquer l'essentiel de l'information contenu dans un tableau de données. L'ACP est une méthode factorielle car elle permet la réduction du nombre de variables par la construction de nouvelles variables synthétiques obtenues par combinaisons des caractères initiaux (Bouroche et Saporta, 1992 ; cité par Demeusy, 2007).

Les composantes principales sont obtenues par diagonalisation de la matrice de covariance afin d'avoir des données homogènes en nature et en ordre de grandeur, ou par diagonalisation de la matrice des corrélations bivariées. La covariance est un nombre permettant d'évaluer le sens de variation de deux variables et de qualifier l'indépendance de ces dernières. Pour la construction de cette dernière, une étude préalable des données initiales est nécessaire et consiste à déterminer des variables centrées et réduites comprises entre 0 et 1 (V_{cr}) afin de s'affranchir des problèmes liés aux différentes unités. La formule mathématique utilisée est la suivante :

$$V_{cr} = \frac{x_j^n - \bar{x}_j}{\sigma_j} \quad \text{Equation 1}$$

x_j^n représente les valeurs de la variable j , \bar{x}_j sa moyenne et σ_j son écart type

La diagonalisation de la matrice définit un ensemble de valeurs propres (pourcentages de variances expliquées), donnant la part d'information visible sur chaque composante, associées à des vecteurs propres, contenant les coefficients à affecter aux variables initiales qui permettent le calcul des composantes. Les représentations graphiques sont de 2 types : le diagramme de dispersion des variables et celui des individus dans le plan.

Le diagramme de dispersion des variables représente la matrice des corrélations entre les variables initiales étudiées et les composantes. Les coordonnées des variables situées dans le plan principal correspondent aux coefficients de corrélation r avec chaque composante.

Le diagramme de dispersion des individus permet de déterminer les ressemblances, traduites graphiquement par une proximité dans le plan principal, ou bien les différences traduites par un éloignement des individus projetés, des composantes considérées sur un graphique en 2 dimensions.

L'ACP peut être employée pour discriminer différentes eaux selon leurs niveaux d'eutrophisation à partir d'une banque de données de paramètres physico-chimiques (ex : COT, COD, oxydabilité aux KMnO_4 , P, pH, conductivité) (Parinet *et coll*, 2004). Cet outil statistique peut également être mis à profit pour caractériser la MO à partir des sous-produits de pyrolyse après fractionnement des eaux. En effet, lors d'une étude, les fractions HPO et TPH des eaux brutes et celles issues des filières de traitement d'eaux potables (en aval) ont pu être discriminées. Les premières sont composées de sous-produits aromatiques et les secondes sont composées de sous-produits de polysaccharides différents : de cyclopentenones et de butanones pour les HPO et de dérivés de Furannes pour les TPH (Demeusy, 2007).

Dans le paragraphe suivant, d'autres moyens d'évaluation de la qualité des eaux sont mis en oeuvre en se basant sur les espèces végétales présentes sur les berges d'un lac ou d'une rivière, il s'agit des macrophytes, des bioindicateurs de la qualité des eaux (Haury *et coll*, 2005).

I.3/ LES MACROPHYTES : DES BIOINDICATEURS DE LA QUALITE DES EAUX

Des groupes caractéristiques de macrophytes sont retrouvés selon le niveau de pollution des eaux et des sédiments (Bournerias, 1972 ; Bournerias, 1979 ; Grasmück, 1995). En effet, des espèces comme *Myriophyllum alterniflorum*, *Potamogeton polygonifolus*, *Elatine hexandra*, et *Riccia fluitans* sont caractéristiques d'eaux oligotrophes ou mésotrophes. Les marais oligotrophes sont plutôt caractérisés par un groupement à Litorelle et thérophytes

(groupement amphibie) très dépendant des conditions météorologiques et présents sur des grèves argilo-sableuses émergées en arrière-saison. Un autre groupement marque le caractère oligotrophe et caractérisé par la présence de *Sphagnum auriculatum* et *Hypericum helodes*. Ces espèces sont observées lorsque les eaux sont basses, sans oublier l'espèce *Scapania undulata* qui est aussi présente dans des eaux oligotrophes et faiblement minéralisées (Grasmück, 1995). Les groupements amphibies associant *Alisma plantago-aquatica*, *Oenanthe aquatica* et *Rorippa amphibia* sont présents dans les eaux calmes et les marais eutrophes (Bournérias, 1972). Un autre groupement de vivaces espèces amphibies (*l'Eleocharetum palustris* (espèce *Eleocharis palustris*)) se retrouvera sur les rives inondables à caractères mésotrophes. D'autres espèces sont de bons marqueurs de l'eutrophisation du milieu comme *Phalaris arundinacea* (Bournérias 1979) qui constituent l'espèce principale de la *Phalaridaie*. Certaines, sont aussi sensibles au pH du milieu et à la nature des sols. En effet, *Carex vesicaria* montre une tendance un peu acidophile du milieu et *Carex acutiformis* est présente dans les sols minéraux, alcalins ou peu acides.

Des auteurs (Robach *et coll*, 1996 ; cité par Haury *et coll*, 2006) ont également montré que quelques espèces aquatiques étaient caractéristiques du niveau de concentrations en NH_4^+ et en PO_4^{3-} . En effet, *Potamogeton coloratus* est caractéristique d'un milieu oligotrophe ($[\text{NH}_4^+] = 14 \mu\text{g/L}$; $[\text{PO}_4^{3-}] = 7 \mu\text{g/L}$) alors que *P. nodosus* est retrouvé dans un milieu hypereutrophe ($[\text{NH}_4^+] = 255 \mu\text{g/L}$; $[\text{PO}_4^{3-}] = 191 \mu\text{g/L}$).

A ce jour, une étude (Penning *et coll*, 2008) a été conduite à l'échelle européenne sur 1147 lacs dans 12 états différents afin de classer les macrophytes selon le niveau de l'eutrophisation en tenant compte de leur présence et leur abondance. Les espèces sont classées dans 3 catégories selon le niveau de sensibilité :

- Les espèces sensibles qui se développent dans les lacs oligotrophes/mésotrophes et qui disparaissent lorsque le milieu tend vers l'eutrophisation.
- Les espèces tolérantes qui sont présentes et deviennent abondantes au sein d'un milieu eutrophe. Ces espèces sont rares voire inexistantes dans les lacs oligotrophes.
- Les espèces présentes dans les lacs oligotrophes et eutrophes.

Le tableau 8 met en évidence les macrophytes sensibles et résistants retrouvés dans les lacs Européen. Ces macrophytes donnent alors des indications sur la classe trophique d'une eau (Penning *et coll*, 2008).

Tableau 8 : Liste des macrophytes sensibles et tolérants retrouvés au niveau des lacs Européens (d'après Penning *et coll*, 2008).

| Les espèces sensibles | Les espèces tolérantes |
|-----------------------------------|--|
| <i>Eleocharis acicularis</i> | <i>Callitriche cophocarpa</i> |
| <i>Isoetes echinospora</i> | <i>Ceratophyllum demersum</i> |
| <i>I. lacustris</i> | <i>Elodea nuttallii</i> |
| <i>Littorella uniflora</i> | <i>Myriophyllum verticillatum</i> |
| <i>Lobelia dortmanna</i> | <i>Potamogeton crispus</i> |
| <i>Ranunculus reptans</i> | <i>P. obtusifolius</i> |
| <i>Subularia aquatica</i> | <i>P. pectinatus</i> |
| <i>Callitriche hamulata</i> | <i>P. pusillus</i> |
| <i>Myriophyllum alterniflorum</i> | <i>P. trichoides</i> |
| <i>M. sibiricum</i> | <i>Ranunculus circinatus</i> |
| <i>Potamogeton filiformis</i> | <i>Zannichellia palustris</i> |
| <i>P. polygonifolius</i> | <i>Nymphoides peltata</i> |
| <i>P. nitens</i> | <i>Sagittaria sagittifolia et natans</i> |
| <i>P. Zizii</i> | <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> |
| <i>Ranunculus confervoides</i> | <i>Lemna minor</i> |
| <i>R peltatus</i> | <i>Lemna triscula</i> |
| <i>Utricularia australis</i> | <i>Salvinia natans</i> |
| <i>U. intermedia</i> | <i>Spirodela polyrrhiza</i> |
| <i>U. minor</i> | <i>Stratiotes aloides</i> |
| <i>U. ochroleuca</i> | <i>Trapa natans</i> |
| <i>Nuphar lutea et pumila</i> | <i>Nitellopsis obtusa</i> |
| <i>Sparganium angustifolium</i> | |
| <i>S. hyperboreum</i> | |
| <i>Clara delicatula</i> | |
| <i>C. rudis</i> | |
| <i>C. strigosa</i> | |
| <i>Tolypella canadensis</i> | |

Plus récemment, des auteurs (Haury *et coll*, 2006) ont développé des méthodes statistiques pour évaluer le niveau trophique et le niveau de pollution organique d'une eau de rivière en appliquant l'Indice Biologique Macrophytique pour les Rivières (IBMR). Cet indice est fondé sur l'examen des macrophytes applicable aux parties continentales des cours d'eau naturels.

Aussi, en présence de macrophytes et d'hélophytes, le niveau de certains polluants contenus dans les eaux eutrophes comme l'azote et le phosphore peuvent être éliminés avec

de bons rendements (Picard *et coll*, 2005). Toutefois, les capacités épuratoires de ces organismes sont limitées. Elles sont dépendantes du niveau de pollution auxquels ils sont exposés.

I.4/ L'ÉPURATION DES EAUX PAR LES MACROPHYTES

Actuellement, il existe deux techniques principales d'épuration des eaux s'appliquant aussi bien au traitement des eaux usées qu'à la production d'eau destinée à la consommation humaine : les techniques physico-chimiques et l'épuration biologique dont certains systèmes utilisent les végétaux.

I.4.1/ Les procédés physico-chimiques

Des études à l'échelle laboratoire ont montré que certains composés chimiques (cendres de charbon) renaient efficacement de nombreux contaminants contenus dans les eaux comme les cations, les anions et les composés organiques dissous (Yan *et coll*, 2007). Des éléments comme le P dans les eaux peuvent être éliminés par des procédés chimiques mettant en oeuvre les phénomènes d'adsorption et/ou de précipitation. En effet, l'ajout dans les eaux à décontaminer, de fines particules de Schwertmannite inactivées ou activées par des filtres magnétiques ou bien l'ajout d'hématite (Eskandarpour *et coll*, 2006), ou encore l'ajout de gypse (Varjo *et coll*, 2003 ; Moon *et coll*, 2006) permettent d'éliminer le P avec efficacité. Les zéolites synthétisés à partir de cendres de charbon acidifiées à 0,01 M d'acide sulfurique (Zhang *et coll*, 2006b) sont également capables de réduire efficacement et simultanément le P et les ions ammonium dans des gammes de concentrations en P allant de 0,5 à 1000 mg/L. D'autres procédés comme l'électrocoagulation sont utilisés pour éliminer le P des eaux destinées à la consommation humaine (Vasudevan *et coll*, 2008).

Aussi, les **scories** qui sont les déchets de l'élaboration du métal placées au fond d'un marais présentent des intérêts importants dans l'élimination du P contenu dans les eaux. C'est pourquoi, la compréhension des différents mécanismes à l'origine de la rétention du phosphore par les scories représente un thème de recherche particulièrement d'actualité (Comeau *et coll*, 2006). La Figure 12 montre la complexité des mécanismes mis en jeu par les scories.

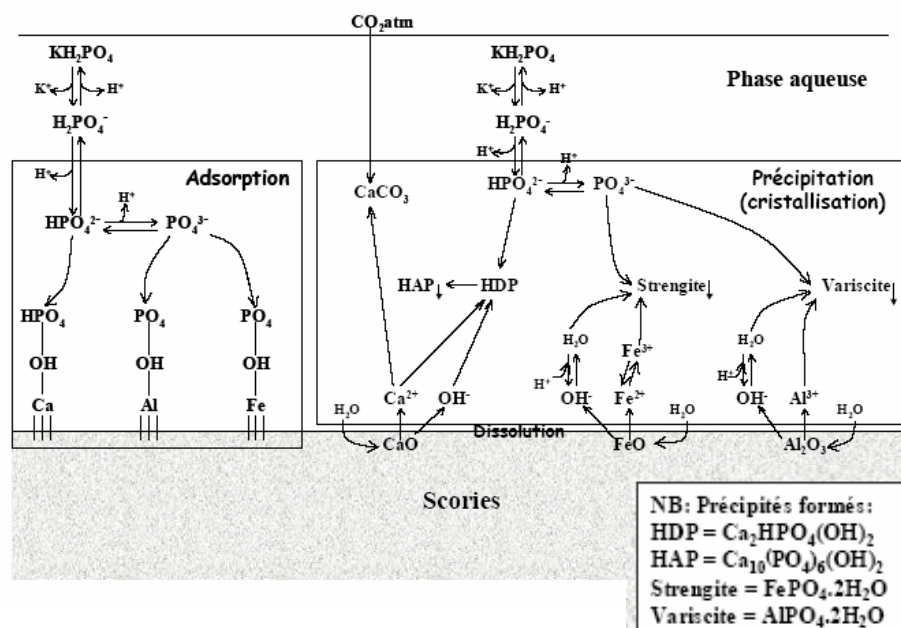


Figure 12 : Schéma des principaux mécanismes réactionnels intervenant dans la déphosphatation d'un effluent par les scories d'aciéries (Comeau *et coll*, 2006)

La Figure 12 décrit l'ensemble des réactions impliquant des phénomènes d'adsorption et de précipitation qui sont principalement à l'origine du traitement du phosphore. Ces procédés très efficaces pour éliminer le P peuvent présenter des limites d'utilisation qui sont liées à leur capacité à faire précipiter les carbonates. Les paramètres qui influencent les mécanismes réactionnels sont la nature et la granulométrie des scories. En effet, selon le type de procédé de purification et de minerai de fer (type de fourneau utilisé, nature des minerais), la réactivité et l'efficacité des scories peut varier de manière importante. La granulométrie intervient également notamment avec des scories de 2 à 6 mm de diamètre pouvant induire un colmatage lié à une plus grande vitesse de relargage en OH^- et en Ca^{2+} qui est d'autant plus rapide que la scorie est petite.

Les lits de scories sont généralement utilisés en traitement tertiaire. Ainsi, à la station d'épuration de Waiuku (Shilton *et coll*, 2006 ; cité par Comeau *et coll*, 2006), le bassin a été dimensionné pour permettre un temps de résidence de 3 jours et contenant des scories d'une taille moyenne de 10-20 mm. Les résultats préliminaires montrent une efficacité de rétention de 70 % environ de P pendant 5 année de fonctionnement ce qui correspond à une rétention de 1,25 kg de P par tonnes de scories.

En raison des problèmes de colmatage rencontrés au bout d'un mois de fonctionnement malgré l'efficacité d'épuration vis-à-vis du phosphore (plus de 99 % de

phosphore retenu), des procédés constitués de plusieurs colonnes (4 séries noté A, B, C, D) contenant les scories ont permis de limiter ce problème. La colonne contenant un mélange tertiaire (calcaire, gravier, scories) a pour but de saturer l'effluent en Ca^{2+} , et les colonnes contenant un mélange secondaire (gravier, scories) sont mises en œuvre pour réduire la cimentation des scories entre elles. Les scories de plus grande granulométrie (5 à 10 mm) ont été testées pour réduire les problèmes de réactivité entre elles et de colmatage. Avec ces procédés, lorsqu'un flux massique d'entrée est proche de $40 \text{ mg P.jours}^{-1}$ dans chaque série de colonnes, les flux de sortie ne sont jamais supérieurs à $2,5 \text{ mg P.jours}^{-1}$. L'efficacité de rétention est toujours supérieure à 85 %.

D'autres études en laboratoire ont montré que lorsque la concentration en scories est de $7,5 \text{ g/L}$, avec un temps de contact de 2h, une valeur de pH équivalente à 6,5, le phosphore est éliminé à plus de 99 % (Lan *et coll*, 2006).

I.4.2/ Les procédés biologiques

Les procédés biologiques (stations d'épuration) sont le plus souvent utilisés pour le traitement secondaire des eaux résiduaires urbaines et industrielles pour éliminer des composés carbonés solubles (glucides, lipides, protéines) pour lesquels la voie physico-chimique est souvent peu efficace, onéreuse ou difficile à mettre en œuvre. Différents procédés d'épuration biologique sont utilisés et peuvent être classés en fonction des conditions d'aération et selon si les micro-organismes sont fixés ou pas. Ainsi, on distingue :

- Les procédés aérobies à boues activées (cultures libres) ou à cultures fixées.
- Les procédés anaérobies à cultures libres ou à cultures fixées.

I.4.2.1/ Mécanismes de l'épuration biologique

L'épuration par les procédés biologiques des composés organiques peut se réaliser suivant 2 mécanismes (Carlson et Silverstein, 1998) :

- Par sorption de la MON au sein du biofilm.
- Par biodégradation

Ces auteurs ont montré que pour des molécules neutres de faibles poids moléculaires (< 500 unité masse atomique (uma)), la sorption est meilleure par rapport à des tailles de molécules dépassant 10000 uma). Le phénomène de sorption est moins marqué avec des molécules chargées négativement. Cela est certainement lié aux répulsions électrostatiques entre ces molécules et le biofilm (Carlson et Silverstein, 1998).

Il existe également des procédés biologiques plus naturels ayant montré leurs efficacités comme le lagunage.

I.4.2.2/ Le lagunage

Le lagunage est un procédé naturel d'épuration réalisé grâce à un équilibre biologique, auquel participent les bactéries, le zooplancton, les algues et aussi certains végétaux sont utilisés notamment les roseaux (Pietrasanta et Bondon, 1994 ; Morel *et coll*, 1994). Ce procédé consiste à l'aménagement de plusieurs bassins en série (le plus souvent 3 bassins). Dans le bassin de tête, les matières en suspension de l'eau brute décantent. Ensuite, les bactéries assimilent la pollution dissoute, et l'oxygène nécessaire à cette dépollution est fourni par les algues (photosynthèse). Le zooplancton consomme les algues pour maintenir un équilibre. Cependant, de nombreuses algues peuvent se multiplier et engendrer une pollution secondaire (Steinmann *et coll*, 2002). Les phragmites sont parfois utilisés pour filtrer l'eau en sortie avant le rejet dans le milieu naturel. Le lagunage naturel peut être utilisé en traitement complet des effluents d'eaux usées ou en traitement tertiaire pour affiner la qualité de l'eau traitée par une boue activée. Ces procédés sont peu coûteux et efficaces en termes d'épuration.

I.4.2.3/ Le lagunage associé à un filtre planté de macrophytes

Les filtres plantés de roseaux peuvent être utilisés à petite échelle pour épurer les eaux usées (assainissement collectif). En 2002, Steinmann *et coll.* ont développé un procédé de traitement des eaux usées associant une lagune et un système de filtre sur lit de gravier et planté d'hélophytes comme il est décrit sur la figure suivante.

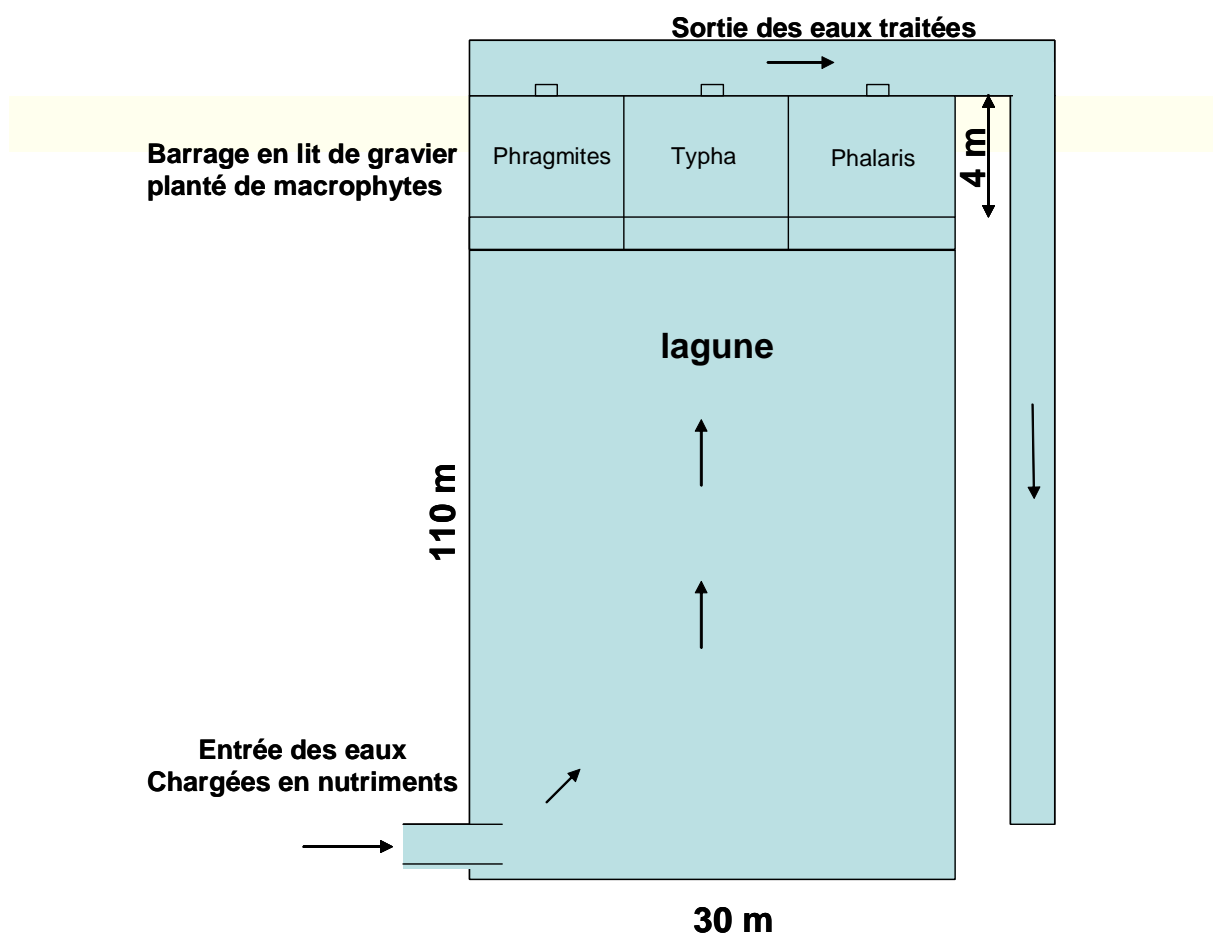


Figure 13 : Schéma des procédés d'épuration associant une lagune à un filtre de végétaux (Steinmann et coll, 2002)

La Figure 13 montre une lagune associée à un lit de gravier planté de végétaux (*Phragmites australis*, *Typha latifolia/augustifolia* et *Phalaris arundinacea*). Ces macrophytes sont connus pour être résistant à de fortes concentrations de nutriments et aux fluctuations physico-chimiques. Ce procédé permet de réduire les concentrations en azote de 51,1 % en moyenne et en phosphore de 39,6 % en moyenne avec une charge initiale à l'entrée de la lagune de 16,1 mg/L d'azote et de 2,12 mg/L de phosphore. En amont du filtre (lagune), la concentration en azote est de 9,9 mg/L, et à la sortie du filtre planté de macrophytes la concentration est de 7,9 mg/L. Le phosphore est également retenu par la lagune (concentration en phosphore total : 1,52 mg/L) et par le filtre (1,28 mg/L). Ce procédé permet également de réduire le COD dont la concentration varie en moyenne de 85 mg/L (charge à l'entrée de la lagune) à 77 mg/L en amont du filtre jusqu'à atteindre une concentration de 53 mg/L à la sortie du filtre soit un abattement de 38 % en moyenne avec un rôle majeur au niveau du filtre. Le filtre a permis de réduire le taux de chlorophylle a de 37,6 % en moyenne sur 3 années d'études. Le

compartiment contenant *Phalaris arundinaceae* a permis de réduire le taux de chlorophylle a de 34,8 %, celui contenant *Typha latifolia* de 36,5 % et celui contenant *Phragmites australis* de 41,6 %. Ce procédé couplant le lagunage et un filtre à macrophytes adapté pour retenir efficacement les algues (Steinman *et coll*, 2002) et retient aussi efficacement le phosphore, l'azote, le COD. Le flux moyen entrant est de $50,1 \text{ m}^3.\text{jours}^{-1}$.

I.4.2.4/ Les marais artificiels

Les plantes aquatiques sont également utilisées dans les marais artificiels. Dans ces derniers procédés, le phosphore est enlevé par une combinaison de processus physiques, chimiques et biologiques, telles la sédimentation, la précipitation, l'adsorption sur les matériaux de remplissage, l'adsorption par les plantes et les transformations microbiennes. L'assimilation du phosphore par les plantes est comprise entre 5 et 15 % environ. En outre, l'enlèvement par les macrophytes n'est permanent que dans la mesure où ils font l'objet d'une récolte annuelle (Comeau *et coll*, 2006).

Exemple de fonctionnement d'un marais artificiel

Les marais sont dimensionnés (Figure 14) sur une base de dégradation de $11 \text{ g DBO}_5.\text{m}^{-2}.\text{jours}^{-1}$ et d'une charge hydraulique limite correspondante de $2,3 \text{ m}^3.\text{jours}^{-1}$. La charge hydraulique a été imposée pour permettre le meilleur établissement possible des plantes (*Typha sp.*) sans limiter l'apport en eau et en nutriments. Les marais sont aérés grâce à deux tuyaux parallèles perforés (avec un espacement de 1,0 m) ont été déposés près de la tranchée d'alimentation dans le sens de la longueur pour aérer les marais (débit d'air de $10 \text{ m}^3/\text{h}$) et minimiser le colmatage par formation de biofilm.

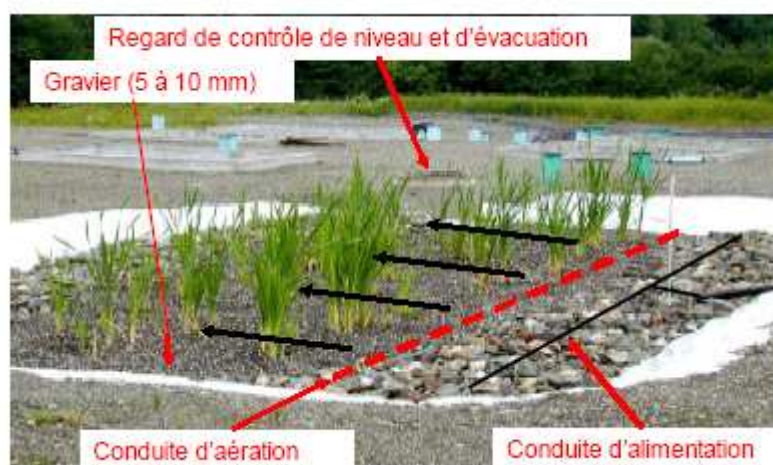


Figure 14 : Photographie et représentation schématique de l'installation d'un marais artificiel

Les marais artificiels ne permettent pas de retenir le phosphore de manière satisfaisante à long terme. C'est pourquoi dans certains cas, afin d'améliorer le traitement, les marais artificiel ont été associés à des scories d'aciéries.

De nombreux travaux ont mis en évidence que les microorganismes associés aux macrophytes pouvaient épurer les eaux naturelles ou usées (Körner et Vermaat, 1998, Picard *et coll*, 2005, Bourgues et Hart, 2007, Thorén, 2007). En effet, les bactéries et les algues sont capables de se fixer sur les végétaux pour former des biofilms soit au niveau racinaire ou soit en zone immergée. Ces derniers sont des biofilms épiphytiques.

I.5/ LES BIOFILMS

I.5.1/ Définition

Un **biofilm** est généralement défini comme une communauté de microorganismes adhérant à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice de polysaccarides adhésive et protectrice. Cette organisation constitue le mode de croissance préféré des bactéries (Costerton *et coll*, 1994 : cité par Hiernaux).

I.5.2/ Composition

I.5.2.1/ Composition biologique

Les biofilms présents dans les environnements aquatiques sont composés d'un consortium très complexe de microorganismes (Keevil, 1999). Le « monde vivant » constituant un biofilm est majoritairement représenté par les bactéries, les champignons, les algues, les diatomées, et les protozoaires. Les biofilms sont retrouvés sur de nombreux supports dans le milieu naturel comme les pierres (biofilm épilithique), dans les profondeurs (benthique), le sable (épipsammique), les végétaux (épiphytique).

I.5.2.1.1/ Les bactéries

Les bactéries représentent une biomasse cellulaire très variable au sein du biofilm. Elle peut être comprise entre 20 % et 90 % par rapport à la MO totale de l'ensemble de la structure du biofilm (Nielsen *et coll*, 1997). La composition élémentaire d'une bactérie est de l'ordre de 50 % de carbone, 30 % d'oxygène, 7 % d'hydrogène et 10 % pour l'azote (Shimizu *et coll*,

1978 ; cité par Hiernaux, 2005). Les bactéries présentes dans les eaux naturelles et au sein des biofilms sont très variées. En effet, de nombreux genres bactériens sont retrouvés dans les biofilms comme *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Rhodococcus*, *Serratia* (Rusznayk *et coll*, 2008).

I.5.2.1.2/ Les algues

Les algues sont des êtres vivants capables de photosynthèse dont le cycle de vie se s'effectue généralement en milieu aquatique. Elles constituent une part très importante de la biodiversité, et une des bases des réseaux trophiques des milieux aquatiques d'eaux douces, saumâtres et marines. Dans les milieux naturels, la présence d'algues au sein des biofilms est très fréquente d'autant plus que ces dernières peuvent prédominer au sein du biofilm. En effet, les apports anthropiques (agriculture, eaux usées urbaines) enrichissent les eaux naturelles en nutriments favorisant le développement de ces organismes photosynthétiques (Sabater *et coll*, 2000 ; Sabater *et coll*, 2003).

I.5.3.1.3/ Les algues à parois de silicium : les diatomées

Les diatomées (ou bacillariophycées) sont des micro-algues unicellulaires appartenant à l'embranchement des chromophytes (algues brunes), caractérisées particulièrement de frustules siliceuses (Germain, 1981) et des chloroplastes contenant de la fuxoxanthine qui masque la chlorophylle contribuant ainsi la couleur brune. Elles diffèrent entre elles par leurs tailles et leurs morphologies (allongées, circulaires). Les biofilms formés par les diatomées sont très communs dans les environnements aquatiques. Les communautés de diatomées colonisent les substrats après la formation d'une matrice de MO et de bactéries. Dans un premier temps, les petites diatomées (*Cocconeis placentula*) adhèrent aux substrats. Des espèces érigées sont aussi rattachées aux substrats (*Synedra sp.*) pour former la couche de base du biofilm. D'autres espèces moins adhésives se développent au sein du biofilm par l'intermédiaire de sécrétions mucilagineuses (*Cymbella sp.*, *Gomphonema sp.*). Ces espèces constituent les premières formes à recouvrir les diatomées adhérentes. Enfin, des espèces filamenteuses (*Aulacoseira sp.*, *Melosira varians*) viennent coloniser le substrat, une troisième strate est alors mise en place dans la formation du biofilm (Müller, 1999 ; Hoagland *et coll*, 1993 : cité par Gold, 2002).

Les diatomées sont de bons indicateurs de qualité des eaux : acidité, salinité, niveau et nature des pollutions organiques. Un indice biologique diatomée (IBD) existe pour évaluer la qualité des eaux (Prygiel *et coll*, 1996) et s'appuie sur des inventaires diatomiques acquis sur

l'ensemble des réseaux de surveillance de la qualité des eaux françaises entre 1975 et 1994 soit 1332 inventaires. Cela apporte des informations complémentaires parfois plus fiables que les analyses chimiques qui sont trop instantanées.

I.5.3.1.4/ Composition biologique des eaux propres et des eaux eutrophes

Suivant la qualité de l'eau, les communautés représentant le phytoplancton sont différentes. En effet, le tableau 9 montre certaines espèces qu'il est possible de retrouver dans les eaux de bonnes qualités et enrichies en MO.

Tableau 9 : Comparaison des espèces phytoplanctoniques présentes dans les eaux « propres » et les eaux enrichies en MO.

| Espèces retrouvées dans les eaux de bonnes qualités | Espèces retrouvées dans les eaux organiquement enrichies |
|--|---|
| <i>Cyanobactéries</i> | |
| <i>Agmenellum quadriduplicatum glauca</i> type | <i>Agmenellum quadriduplicatum tenuissima</i> type |
| <i>Calothrix parietina</i> | <i>Anabaena constricta</i> |
| <i>Coccochoris stagnina</i> | <i>Anacystis montana</i> |
| <i>Entophysalis lemaniae</i> | <i>Artospira jenneri</i> |
| <i>Microcoleus subtorulosus</i> | <i>Lyngbya digueti</i> |
| <i>Phormidium inundatum</i> | <i>Oscillatoria sp</i> |
| | <i>Phormidium autumnale</i> |
| | <i>Phormidium uncinatum</i> |
| <i>Algues vertes</i> | |
| <i>Ankistrodesmus falcatus</i> , var. <i>acicularis</i> | <i>Chlorella pyrenoidosa</i> |
| <i>Bulbochaete mirabilis</i> | <i>Chorella vulgaris</i> |
| <i>Chaetopheltis megalocystis</i> | <i>Chlorococcum numicola</i> |
| <i>Cladophora glomerata</i> | <i>Scenedesmus quadricola</i> |
| <i>Draparnaldia plumosa</i> | <i>Spirogyra communis</i> |
| <i>Euastrum oblongum</i> | <i>Stichococcus bacillaris</i> |
| <i>Gloecoccus schroeteri</i> | <i>Stigeoclonium tenue</i> |
| <i>Micrasteria truncata</i> | <i>Tetraedron muticum</i> |
| <i>Diatomées</i> | |
| <i>Amphora ovalis</i> | <i>Gomphonema parvulum</i> |
| <i>Cocconeis placentula</i> | <i>hantzschia amphioxys</i> |
| <i>Cyclotella badanica</i> | <i>Melosira varians</i> |
| <i>Cymbella cesati</i> | <i>Navicula cryptocephala</i> |
| <i>Meridion circulare</i> | <i>Nitzschia acicularis</i> |
| <i>Navicula esigua</i> var. <i>capitata</i> | <i>Nitzschia palea</i> |
| <i>Navicula gracilis</i> | <i>Surirella ovata</i> |
| <i>Nitzschia linearis</i> | |
| <i>Pinnularia nobilis</i> | |
| <i>Pinnularia subcapitata</i> | |
| <i>Surirella splendida</i> | |
| <i>Synedra acus</i> var. <i>angustissima</i> | |
| <i>Flagellates</i> | |
| <i>Chromulina rosanoffi</i> | <i>Carteria multifilis</i> |
| <i>Chroomonas nordstetii</i> | <i>Chlamydomonas reinhardi</i> |

| | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>Chroomonas setoniensis</i> | <i>Chlorogonium euchlorum</i> |
| <i>Chrysococcus major</i> | <i>Cryptoglena pigra</i> |
| <i>Chrysococcus ovalis</i> | <i>Euglena agilis</i> |
| <i>Chrysococcus rufescens</i> | <i>Euglena deses</i> |
| <i>Dinobryon stipitatum</i> | <i>Euglena gracilis</i> |
| <i>Euglena ehrenbergii</i> | <i>Euglena oxyuris</i> |
| <i>Euglena spirogyra</i> | <i>Euglena polymorpha</i> |
| <i>Mallomonas caudata</i> | <i>Euglena viridis</i> |
| <i>Phacotus lenticularis</i> | <i>Lepocinclis texta</i> |
| <i>Phacus longicauda</i> | <i>Pandorina morum</i> |
| <i>Rhodomonas lacustris</i> | <i>Phacus pyrum</i> |

(suite et fin du Tableau n°9)

I.5.2.2/ Composition minérale

Plusieurs auteurs s'accordent à penser que la composition en minéraux des eaux jouent un rôle important dans le développement et la structure du biofilm (Chen *et coll*, 1996 ; Hiernaux, 2005). En effet, de nombreux éléments chimiques sont retrouvés au sein des biofilms comme le fer, le manganèse, le silicium, les carbonates (Brown *et coll*, 1999 ; Hiernaux, 2005 ; Miyata *et coll*, 2007). Des éléments comme le zinc, l'aluminium, le cobalt, l'arsenic, le nickel et bien d'autres y sont également retrouvés. Le calcium, le magnésium, le sodium, le chlore sont également incorporés dans les biofilms.

I.5.2.2.1/ Le fer

Le fer est très abondant dans les eaux naturelles et influence de manière importante les caractéristiques physico-chimiques des milieux aquatiques. Le fer peut être retrouvé sous forme d'oxydes, d'hydroxydes ou d'oxy-hydroxydes. Tous les oxydes de fer possèdent du fer (III) et des atomes d'oxygène et/ou des groupements OH mais vont avoir des structures et des compositions différentes (Cornell et Schwertmann, 1996). En effet, dans la nature, de nombreuses formes du fer ont été repertoriés comme la goethite (α -FeO(OH)), l'hématite (Fe_2O_3), la magnétite (Fe_2O_4), la schwertmannite ($\text{Fe}_{16}\text{O}_{16}(\text{OH})_y(\text{SO}_4)_z, n\text{H}_2\text{O}$), la lépidocrocite (γ -FeO(OH)), la ferrihydrite ($\text{Fe}_5\text{HO}_8, 4\text{H}_2\text{O}$), la maghémite (γ - Fe_2O_3), les rouilles vertes et les hydroxydes ferreux.

Dans le système racinaire des végétaux, le fer est rapidement oxydé en présence d'oxygène formant ainsi un dépôt sur les racines (Davidson et Seed, 1983). Ce dépôt a été mis en évidence sur plusieurs hélrophytes comme *Phragmites australis*, *Typha latifolia*, *Juncus bulbosus*. En 2001, Hansel *et coll* ont alors montré que sur les racines de l'espèce *Phalaris arundinacea*, les formes du fer prédominantes sont la ferrihydrite (63 %), la goethite (32 %)

et la sidérite (5 %). De plus, les oxydes de fer hydratés et les bactéries influencent la disponibilité et la mobilité des métaux dans la rhizosphère des plantes aquatiques (Hansel *et coll*, 2001). Certaines bactéries présentes au sein du biofilm doivent jouer un rôle dans la formation du dépôt de fer sur les racines (Weiss *et coll*, 2005).

I.5.2.2.2/ Le manganèse

Cet élément est le second métal de transition le plus abondant de la croûte terrestre. Il peut présenter différents états d'oxydation dans le milieu naturel (II, III, IV).

A des pH proches de 7, le manganèse contenu dans l'eau est majoritairement sous forme Mn^{2+} et est incorporé au sein du biofilm puis oxydé par les bactéries (*P. putida*, *L. discophora*) ou les champignons (ascomycètes) en MnO_2 (Miyata *et coll*, 2007). Néanmoins, en 2005, Webb *et coll* ont montré que l'oxydation du Mn (II) par les spores de *Bacillus* pouvait passer d'un degré d'oxydation IV via un degré d'oxydation intermédiaire Mn (III). Les processus d'oxydation du Mn jouent un rôle important dans l'élimination de certains métaux contenus dans les eaux naturelles. En effet, le zinc (II) et l'arsenic (V) s'adsorbent très bien sur les oxydes de Mn (Tani *et coll*, 2004 ; Miyata *et coll*, 2007). Cependant, il existe des interactions avec les oxydes de Mn pouvant limiter l'adsorption de certains métaux comme l'As (V) notamment par la présence de Ni (II), Co (II) et de Zn (II). En 2005, Murray *et coll* ont montré l'importance du processus biologique de formation des oxydes de Mn dans l'oxydation du Cr (III) en Cr (IV) mobile. Ce processus pourrait permettre de capter le Cr présent sur des sites pollués (Miyata *et coll*, 2007). En résumé, une meilleure compréhension des processus biologiques d'oxydation du Mn (II) et des interactions des oxydes de Mn (IV) avec les métaux et les métalloïdes est nécessaire car ces processus se révèlent potentiellement intéressants pour dépolluer des eaux contaminées par ces composés toxiques.

I.5.2.2.3/ Les carbonates

Ces minéraux sont parmi les plus réactifs dans les milieux aquatiques. Il en existe sous différentes formes comme les carbonates de calcium ($CaCO_3$), de magnésium ($MgCO_3$), de manganèse ($MnCO_3$), de zinc ($ZnCO_3$), de fer ($FeCO_3$). Les deux principaux qui peuvent être formés par les microorganismes sont la calcite et l'aragonite (Banfield et Hamers, 1997) de structure $CaCO_3$. D'autres composés carbonatés sont présents dans les eaux naturelles comme la dolomite ($CaMg(CO_3)_2$) et la sidérite ($FeCO_3$). Des composés comme la rhodochrosite ($MnCO_3$), l'hydrozincite ($Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$), la sidérite peuvent être retrouvés à la surface des racines de *Phalaris arundinacea* (Hansel *et coll*, 2004).

I.5.2.2.4/ Le silicium (hors silicates)

La forme la plus répandue est le quartz alpha SiO_2 . La silice colloïdale est une autre forme de quartz qui est souvent retrouvé dans les milieux aquatiques. En présence d'eau, la surface de ce composé s'hydroxyle pour former majoritairement des groupes silanols (SiOH). Ces derniers s'ionisent ce qui génère des protons en créant une charge de surface dépendante du pH mais pouvant être écrantée par les substances organiques recouvrant le minéral.

I.5.2.2.5/ Les silicates

Les silicates constituent 97 % de la croûte terrestre. Des minéraux silicatés les plus importants en abondance et en interactions avec les milieux environnant dans les systèmes aquatiques sont les minéraux argileux et la silice. En effet, l'altération mécanique et chimique des roches conduit à la formation de minéraux argileux qui sont des éléments importants des sols. Lors d'épisodes pluvieux, un transfert du sol vers les eaux est possible ce qui influence fortement la composition des eaux de surface.

I.5.2.3/ Formation du biofilm

I.5.2.3.1/ Les différentes étapes

Le biofilm se constitue en plusieurs étapes : une étape d'adhésion ou d'induction, de croissance, et de stabilisation. La Figure 15 montre la croissance du biofilm au cours du temps.

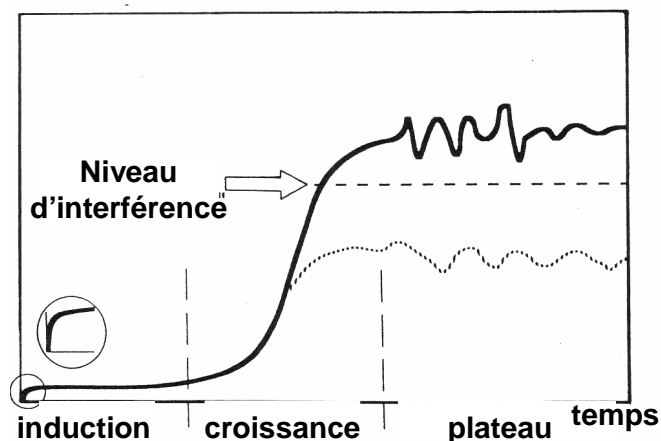


Figure 15 : Courbe schématisant la croissance d'un biofilm au cours du temps

- La première étape est l'**adhésion** ou l'**induction** de micro-organismes mobiles à une surface, principalement par des liaisons chimiques non covalentes ou faibles. Ces liaisons entre la

cellule (protéines) et la surface d'attachement sont de type van der Waals, électrostatique, ou encore acide-base de Lewis. A ce stade, l'adhésion est dite réversible.

L'adhésion irréversible est considérée comme un lien permanent entre supports et microorganismes qui est souvent associée à la production de polymères extracellulaires par les cellules adhérentes impossible à éliminer par simple rinçage (eau). L'adhésion des premiers microorganismes contribue à augmenter la capacité d'ancrage d'autres microorganismes en accroissant et en modifiant les surfaces d'ancrage. De plus, certaines espèces sont incapables d'adhérer directement à un support cependant, elles peuvent se fixer lorsqu'un biofilm est déjà constitué. De nombreux auteurs (Gristina, 1987 ; Escher et Characklis, 1990) ont montré qu'avant l'adhésion des microorganismes à la surface d'un support, des macromolécules (protéines, polysaccharides, acides humiques) et des molécules plus petites comme les acides gras et les lipides sont les premières à adhérer formant ainsi une couche de conditionnement.

- La seconde étape correspond à **la phase de croissance** où les micro-organismes se **divisent**, pour former dans un premier temps des microcolonies. À partir d'une concentration suffisamment dense d'individus, les microcolonies sécrètent des biopolymères formant ainsi le biofilm. Ce dernier se développe puis s'épaissit jusqu'à devenir macroscopique.

- L'étape **de stabilisation** (plateau) correspond à la troisième étape de formation du biofilm. Durant cette étape, certains stress ou carences liés au vieillissement du biofilm, les microorganismes peuvent activement se détacher du biofilm pour retrouver un état "planctonique". De nouvelles surfaces peuvent alors être colonisées. Les microorganismes présents dans le biofilm utilisent parfois les exudats constituant la matrice extracellulaire comme source d'énergie.

La Figure 16 schématise les différentes étapes de la formation d'un biofilm.

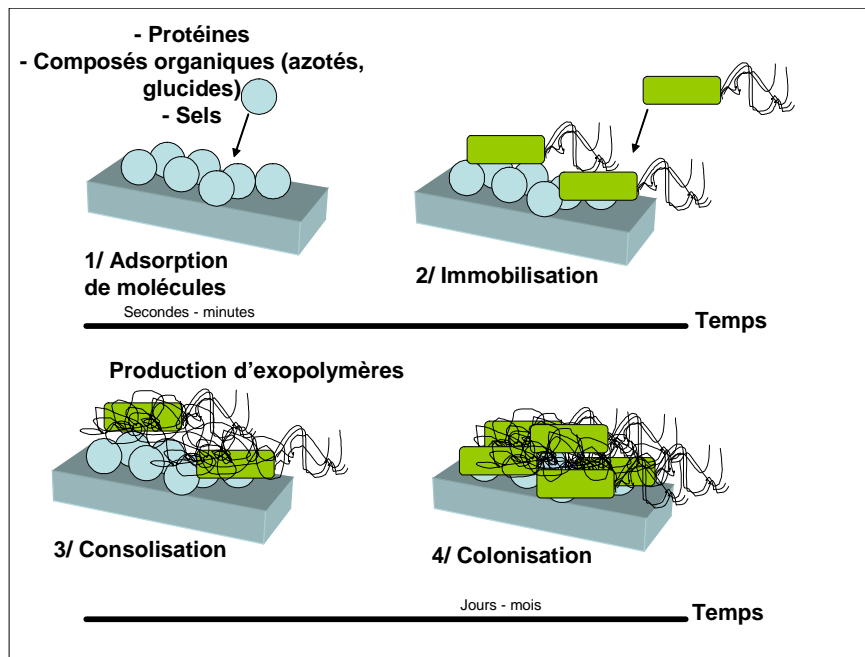


Figure 16 : Schéma représentant les étapes de développement d'un biofilm (Web 7)

La formation d'un biofilm débute par des phénomènes d'adsorption de molécules organiques (glucides, protéines, composés azotés) ou inorganiques (sels) formant une première couche jusqu'à la colonisation *via* l'immobilisation et la consolidation. Durant l'étape d'immobilisation les bactéries vont se fixer sur cette couche préalablement formée et synthétiser des exopolymères (consolidation). Enfin l'étape de colonisation du biofilm s'effectue sur plusieurs jours avant d'atteindre un état de stabilisation du biofilm. Cependant, le biofilm peut continuer à se développer et à modifier sa morphologie pour s'adapter à la composition de l'eau au cours du temps.

I.5.3.2.2/ Les substances polymères extracellulaires (EPS)

Les EPS sont considérés comme étant des composés essentiels de la matrice, responsable de l'intégrité de la structure tridimensionnelle des biofilms. Les EPS sont essentiellement constitués de polysaccharides (acides uroniques, sucres aminés), de protéines, de glycoprotéines, d'acides nucléiques, de (phospho)lipides et de substances humiques dont la composition peut varier selon l'origine du biofilm (eaux usées, eau de surface). Les EPS constituant la matrice organique des biofilms jouent des rôles déterminants pendant le développement de ces agrégats microbiens. De nombreuses fonctions sont attribuées à ces exudats notamment le rôle de barrière de protection (résistance aux antibiotiques), de

rétenction d'eau, d'activités enzymatiques, de sorption d'ions, de stabilité mécanique des biofilms (Flemming *et coll*, 2007).

I.5.3.2.3/ Liaisons intermoléculaires non covalentes et stabilités des biofilms

Les liaisons intermoléculaires non covalentes contribuent à la stabilité mécanique des biofilms (Mayer *et coll*, 1999). Les principales liaisons retrouvées au sein des EPS sont citées ci-dessous (Flemming *et coll*, 1998 ; cité par Hiernaux, 2005) :

- Les interactions électrostatiques répulsives entre les résidus ioniques. Ces interactions sont attendues entre les groupements fonctionnels de charges similaires comme les fonctions carboxyles des protéines et des polysaccharides.
- Les interactions électrostatiques qui ont lieu entre molécules chargées (dipôles induits ou permanents).
- Les forces attractives en présence de cations divalents (Ca^{2+}). Ces derniers se fixent aux charges négatives (groupements carboxyliques) des EPS et peuvent assurer la liaison entre deux groupements chargés négativement en formant des ponts.
- Les liaisons hydrogène se forment majoritairement entre les atomes d'hydrogène des groupements hydroxyle et les atomes d'oxygène et d'azote les plus électronégatifs des polysaccharides et des protéines. Ces liaisons permettent aussi aux molécules d'eau de se lier au EPS intervenant dans la protection contre la dessiccation (Roberson et Firestone, 1992 ; cité par hiernaux).
- Les interactions de London sont des interactions entre dipôles induits.

I.5.3/ Les outils analytiques de caractérisations des biofilms

I.5.3.1/ Les supports à biofilms

Il est bien connu que les biofilms peuvent se constituer sur différents types de supports inertes (verres, plastiques, pierres, sables, supports métalliques) ou vivants (végétaux, animaux). Ces supports peuvent être utilisés pour l'étude et/ou l'élaboration de biofilms comme les supports en verre (Hiernaux, 2005 ; Forêt *et coll*, 2006), en polypropylène (Jöbjen *et coll*, 2004), les supports végétaux (De Nardi, 2007 ; Gagnon *et coll*, 2007 ; Bourgues et Hart, 2007).

I.5.3.2/ Les outils analytiques

I.5.3.2.1/ La Microscopie électronique et la microanalyse X

A ce jour de nombreux outils analytiques sont appropriés pour analyser les surfaces. En effet, le MEB et le MET sont de très bons outils pour étudier la surface d'un support sur lequel un biofilm s'est développé (Flemming *et coll*, 2000 ; Hiernaux, 2005 ; Miyata *et coll*, 2007). La microanalyse X a pour objectif de mettre en évidence tous les éléments chimiques sur une surface donnée. Cet outil analytique permet aussi de réaliser des cartographies par élément (Hansel *et coll*, 2001 ; Hiernaux, 2005) afin de localiser la répartition de ces derniers sur une surface.

I.5.3.2.2/ Méthodes de Dénombrements de microorganismes

Actuellement, il existe de nombreuses méthodes de dénombrements des bactéries et des algues. Parmi elles, le nombre de bactéries peut être évalué par comptage direct en microscopie optique à l'aide de cellules de Thoma (Meyer *et coll*, 2002), bien que la méthode soit peu précise, elle est très facile à mettre en œuvre et nécessite peu de moyen. Le dénombrement de bactéries cultivables sur milieu de culture approprié est une méthode très utilisée en microbiologie (Gauthier *et coll*, 1986). Des méthodes plus précises sont aussi mises en œuvre comme le DAPI qui permet de dénombrer la population totale de bactéries (Rebillard et Torre, 1993), la technique du Bac Light permettant de différencier le nombre de bactéries viables des bactéries perméabilisées (Alleron *et coll*, 2008) à l'aide de sondes moléculaires induisant des fluorescences caractéristiques observables au microscope à l'épifluorescence. Les dénombrements peuvent être réalisés par la recherche d'une activité enzymatique notamment l'activité estérase utilisant la méthode du ChemChrome V6 (Alleron *et coll*, 2008) sans oublier la cytométrie de flux qui permet de quantifier le phytoplancton et les bactéries qui sont des méthodes précises mais on ne différencie pas les cellules vivantes des cellules mortes (Legendre *et coll*, 2001).

Pour quantifier les algues, la mesure de la concentration en chlorophylle *a* est un paramètre qui est très utilisé (Gauthier *et coll*, 1986 ; Parinet *et coll*, 2004). Le dénombrement d'algues ou de diatomées peut être effectué par comptage direct par microscopie optique entre lame et lamelle ou par microscopie inversée (Gauthier *et coll*, 1986).

I.5.3.2.3/ Les outils de mesures d'épaisseurs de biofilm

Les capteurs à biofilm constitués de platine ou d'or (Figure I.8) sont des outils analytiques qui permettent de suivre la formation des biofilms élaborés à partir d'eaux naturelles, par des mesures électrochimiques. Cette méthode met en œuvre la loi de Levich

(Forêt, 2006 ; Gamby et coll, 2009). Lors de récents travaux, un modèle basé sur la conservation de masse, la diffusion et la convection permet de prédire les différents facteurs influençant l'hétérogénéité des biofilms (Rahman et coll, 2009). D'autres techniques d'analyses sont mises en œuvre comme la microscopie confocale qui permet de visualiser la structure tridimensionnelle d'un biofilm et la quantification des différents composants en milieu hydraté (Lawrence *et coll*, 2001 ; Hiernaux, 2005 ; Roldan et Hernandez-Mariné, 2009).

I.5.3.2.4/ Les biologs GN2

Les biologs GN2 permettent d'étudier le profil métabolique des communautés microbiennes présentes dans les eaux naturelles ou bien au sein de biofilms. Ils se présentent sous forme de microplaques composées de 96 puits contenant chacun une source carbonée et un sel de tétrazolum. Ce dernier est un indicateur qui devient coloré (rose violet) lorsqu'il se réduit. Sa réduction met en évidence l'utilisation de la source carbonée car le sel de tétrazolum est réduit par les coenzymes (NADH, H^+) issus de la respiration des microorganismes (Benizri et Amiaud, 2005 ; Rusznyak *et coll*, 2007).

I.5.3.2.5/ Les bioréacteurs à biofilms

Plusieurs types de réacteurs à biofilms ont été développés dans le secteur des procédés appliqués à l'environnement et sont utilisés industriellement pour le traitement des eaux destinées à la consommation humaine (traitement de l'ion ammoniacal, des nitrates, des pesticides), pour le traitement des eaux de procédés, d'effluents urbains et industriels et pour la décontamination des aquifères. Ces bioprocédés fonctionnent en condition aérobie et/ou anaérobie. Il existe des systèmes dans lesquels le biofilm est statique car il adhère sur une surface fixe (lit bactérien, biofiltre) et des systèmes dans lesquels le biofilm circule car il adhère sur un support mobile (lit mobile, fluidisé, réacteur à circulation interne). Il existe également des systèmes hybrides dont une partie du biofilm est fixé sur support et une autre partie est mobile (Paul et Queinnec, 2008).

Les réacteurs à biofilms peuvent être utilisés dans le traitement des métaux lourds. En effet, des études ont été conduites en batch à l'aide de biofilms de *Arthrobacter viscosus* sur des granules de carbone dans le but d'éliminer le chrome dans l'eau avec une efficacité de 99,9 % en 30 jours pour des concentrations initiales à 10 mg. L⁻¹ et de 72 % durant la même période pour des concentrations initiales de 100 mg.L⁻¹ (Quintelas *et coll*, 2009). Des bioréacteurs en anaérobie avec recirculation de biomasse ont montré également une bonne efficacité dans le traitement des sulfates et du COD contenus dans des eaux usées dont les

concentrations sont respectivement de 2,73 g.L⁻¹ et de 3,15 g.L⁻¹. L'efficacité maximale observée dans ces conditions est de 80,9 g COD.L⁻¹.jours⁻¹ et de 41,8 g SO₄³⁻ L⁻¹.jours⁻¹ (Kosinka et Miskiewicz, 2009).

Les bioréacteurs sont des outils très utilisés pour étudier les biofilms. En effet, De nombreux auteurs ont étudié le détachement des biofilms sous l'effet d'un stress hydrodynamique (Rittman, 1982 ; Peyton, 1996 ; Ramasamy et Zhang, 2005). En 2007, Ochoa *et coll*, ont étudié l'érosion des biofilms développés sur des plaques de polypropylène dans des conditions aérobies. En 2005, Hiernaux a étudié la structuration des biofilms élaborés à partir d'eaux de surface au sein d'un bioréacteur à billes de verre.

I.6/ LES MACROPHYTES ET LES BIOFILMS

I.6.1/ Efficacité des macrophytes et des biofilms dans l'élimination des nutriments

De nombreuses études ont montré l'efficacité de l'association végétaux-microorganismes pour éliminer la matière organique contenue dans les eaux usées. En effet, en 2004, Ouellet-plamondon *et coll* ont montré que *Phalaris arundinacea* pouvait éliminer jusqu'à 95 % du COD et la DBO en hiver (COD initial : 15 g de COD/m²/jours et 3g de DBO5/m²/jours). Selon les auteurs, et parmi les autres espèces étudiées dont *Phragmites australis*, *Typha angustifolia*, le faux roseau s'avère être le plus efficace en hiver pour éliminer le COD et la DBO. De plus, une aération artificielle améliore l'élimination du COD aussi bien en été et qu'en hiver (Ouellet-Plamondon *et coll*, 2006). Dans le cas où la charge initiale est de 540 ± 140 mg/L, le COD est éliminé à plus de 90 % et dans les conditions où les concentrations en MES sont de 260 ± 60 mg/L, en N kjeldahl de 16 ± 3, et de 5 ± 1 en P total. Le flux est de 30 L.m⁻².jours⁻¹ avec un temps de rétention approximativement égal à 4 jours.

L'espèce *Phalaris arundinacea* est un macrophyte efficace pour l'épuration du P (Kao *et coll*, 2003) et des phosphates (Picard *et coll*, 2005). Ces derniers ont montré que dans leurs conditions expérimentales, les phosphates sont éliminés jusqu'à 93 % en période estivale (juillet) et jusqu'à 63 % en période hivernale (février). D'autres auteurs ont également montré que l'activité et la densité microbienne étaient importantes au niveau des racines (Gagnon *et coll*, 2007), ce qui doit contribuer à l'élimination des nutriments contenus dans le milieu.

Les Saules (*Salix spp*) sont aussi très efficaces pour épurer un milieu car ils sont capables d'éliminer 46,8 % du P sous forme P_2O_5 en période estivale avec des charges initiales proche de 10 mg/L (Perttu et Kowalik, 1997). Les saules sont également capables d'épurer les sédiments (Vervaeke *et coll*, 2003) et se maintiennent même dans des milieux enrichis en nutriments comme les eaux usées (Pulford et Watson, 2003).

D'autres macrophytes comme les lentilles d'eau (*Lemna gibba L.*, *Lemna minor*) sont connues pour être de bonnes épuratrices d'une eau riche en nutriments. En effet, *Lemna gibba* recouvrant à 100 % la surface d'un système éliminent de 120 à 590 mg N /m²/jour soit 73 à 97 % de l'azote initialement présent et de 14 à 74 mg P.m⁻².jour⁻¹ soit de 63 à 99 % du phosphore total. L'expérimentation a duré 3 jours. Les lentilles d'eau sont directement responsables de 30-47 % de la perte totale d'azote en captant les ions ammonium et probablement aussi dépendant de la concentration initiale en phosphore et allant jusqu'à 52 % de perte totale en phosphore. La contribution indirecte des lentilles d'eau dans l'élimination des nutriments est considérable et inclut l'adsorption des ions ammonium et des **ortho phosphates par les algues et les bactéries formant un biofilm** et aussi l'élimination de l'azote par les bactéries liés aux lentilles d'eau. Ensemble, les pertes azotées sont de 35 à 46% et les pertes en phosphore de 31 à 71%. Approximativement, Körner et Vermaat (1998) ont estimé que les ¾ des pertes (azote et phosphore) sont liées à la présence des lentilles d'eau et seulement ¼ sont liées à la présence de bactéries et d'algues fixées sur les supports (murs, sédiments). D'autres processus comme la volatilisation du NH₃, la fixation de l'azote et les nutriments consommés (nitrification/dénitrification) par les microorganismes en suspension sont négligeables dans ce système mais pourrait devenir importants avec la profondeur de la nappe d'eau et l'augmentation du temps de rétention (Körner et Vermaat, 1998). D'autres espèces comme *Lemna minor* éliminent également le Phosphore (ortho phosphates). En effet, sur une période de 8 jours, la concentration en phosphate passe de 15 mg/L à 0,5 mg/L sur une eau usée (Öbek et Hasar, 2002). De plus, cette espèce peut éliminer rapidement le phénol lorsque la densité de biomasse se situe dans une gamme de 0,7 à 1,4 kg/m² (Oueslati *et coll*, 1999). D' autres auteurs ont aussi montré que *Lemna minor* élimine près de 88 % du COD et 38 % d' ortho phosphates avec des charges initiales respectives de 4000 mg.m⁻².jours⁻¹ et de 73 mg.m⁻².jours⁻¹ et d' un temps de rétention de 3 jours (Uysal et Zeren, 2004).

L'espèce *Juncus effusus* est capable d'accumuler le P. En effet, Shen *et coll* (2003) ont montré que les feuilles peuvent contenir jusqu'à 59,7 kg.ha⁻¹ de P_2O_5 . De plus, 69 % de P

reste dans les tiges après 5 mois de décomposition (Kao *et coll*, 2003).

Le macrophyte *Elodae canadensis* élimine des composés facilement biodégradables comme l'urée (Thorén, 2007). En effet, l'activité des microorganismes présents sur les parties immergées (épiphytique) de l'espèce *Elodae canadensis* permet d'éliminer jusqu'à 0,1 à 0,2 mmol d'urée (N) m⁻².jours⁻¹. Cependant, les microorganismes présents sur les feuilles de *Typha latifolia* éliminent seulement de 0,001 à 0,03 mmol d'urée (N) m⁻².jours⁻¹. Les exudats de *T. latifolia* doivent inhiber la croissance des algues et des bactéries expliquant les différences entre les deux espèces végétales étudiées (Thorén, 2007).

Ces études ont montré que des différences au niveau des capacités épuratoires sont observées selon les plantes utilisées. Ces résultats sont confirmés par d'autres études (Picard *et coll*, 2005). En effet, *Carex lacustris* s'est avéré moins efficace dans l'élimination du P et de l'azote par rapport à d'autres espèces étudiées comme *Scirpus validus*, *Phalaris arundinacea*, *Typha latifolia*. Cela est certainement dû à une quantité moins importante de biomasse dans le sol ou bien à la différence de morphologie des racines par rapport aux autres macrophytes. En effet, Gagnon *et coll* (2007) ont montré que la densité et l'activité microbienne étaient plus importantes en présence de *Phalaris arundinacea* que de *Typha angustifolia* et *Phragmites australis* par conséquent, la morphologie des racines, spécifique de chaque espèce végétales semblent être un facteur important influençant l'interaction entre la plante et les microorganismes. Cependant, l'association de plusieurs plantes améliore leurs capacités à éliminer les nutriments (P et azote). En effet, les populations bactériennes sont souvent plus variées en présence de végétation au sein des zones humides par conséquent, cela pourrait être dû à la diversité de « microhabitats » dans la structure du sol créée par la croissance du système racinaire différents selon les plantes. Ces dernières peuvent aussi constituer des réserves de carbone pour les microorganismes, de ce fait, les macrophytes améliorent leurs chances de survie (Picard *et coll*, 2005).

Ces auteurs ont mis en évidence que la température jouait un rôle important sur l'élimination des nutriments au sein d'une zone humide végétalisée. En général, la consommation des nutriments est plus importante durant la période estivale jusqu'au début de l'automne (de juin à octobre) et moins importante pendant la période hivernale (de novembre à mars). La consommation des nutriments est associée avec la croissance des plantes et avec l'augmentation de la température. Il y a moins de variations saisonnières concernant le phosphore par rapport à l'azote car les sédiments captent le phosphore indépendamment du processus de dégradation biologique. Des auteurs ont montré que les macrophytes associés

aux microorganismes étaient responsables de 90 % environ de l'azote éliminé. Le processus microbiologique joue un rôle majeur dans l'élimination des nutriments et les plantes interviennent en suppléments dans le processus d'élimination de ces derniers (Picard *et coll*, 2005 ; Bourgues *et coll*, 2007).

I.6.2/ Comparaison entre biofilm épiphytique, sédiment et colonne d'eau

Des études récentes montrent que les capacités épuratoires entre les sédiments et l'épiphyton (tige de végétaux) sont comparables vis-à-vis de la dénitrification par conséquent le biofilm épiphytique jouerait un rôle significatif dans l'épuration du milieu naturel vis-à-vis de l'azote (Bourges et Hart, 2007).

Les sédiments permettent d'éliminer 100 fois plus d'urée ($12 - 22 \text{ mmol d'urée (N) m}^{-2} \cdot \text{jours}^{-1}$) par rapport aux élodées. Néanmoins, une grande surface de contact pourrait améliorer l'efficacité de l'espèce *E. canadensis*. En effet, avec ses $23-33 \text{ m}^2$ de surface, dans le cadre de l'étude, ce macrophyte pourrait potentiellement éliminer $2 \text{ à } 7 \text{ mmol d'urée (N) m}^{-2} \cdot \text{jours}^{-1}$ (Thorén, 2007). Enfin, dans la colonne d'eau, l'efficacité de dégradation de l'urée n'est pas significative.

En 2002, Haglund *et coll* ont mis en évidence la part de bactéries actives entre les sédiments, les biofilms épiphytiques et la colonne d'eau. Les bactéries actives sont détectées par leur système de transport d'électrons capable de réduire le sel de tétrazolium CTC (5-cyano-2,3-ditolyltétrazolium chloride). Les fractions actives du nombre total de bactéries détectées par microscopie à fluorescence dans **les sédiments sont de $46 \pm 10 \%$** (sur l'année), **sur les macrophytes (*R. circinatus*), de $37 \pm 18 \%$** et **dans la colonne d'eau, de $4 \pm 4 \%$** . L'abondance de cellules réduisant le CTC est corrélée avec la quantité totale de bactéries, et la fraction de bactéries réduisant le CTC augmente avec la quantité de bactéries totale dans tous les habitats. Par conséquent, les différences dans les fractions de bactéries actives entre les habitats pourraient être attribuées aux différentes densités de bactéries avec une plus large proportion de bactéries actives lorsque les concentrations bactériennes sont plus élevées.

I.6.3/ Effet de la végétation sur l'élimination des bactéries en suspension

Certains auteurs (Karathanasis, 2003) ont étudié les effets de la végétation (*Typha latifolia*, *Festuca arundinaceae*) sur les bactéries fécales, sur la DBO, et les matières en suspension. Aucune différence significative n'a été observée entre les végétaux étudiés. L'élimination des bactéries fécales est supérieure à 93 % (moyenne annuelle). Cependant, les systèmes plantés de végétaux sont plus efficaces pendant la période estivale contrairement aux systèmes dépourvus de végétation qui ont montré une meilleure efficacité l'hiver. Les systèmes contenant les macrophytes réduisent significativement la DBO (>75 %) et les matières en suspension (>88 %) par rapport aux systèmes non végétalisés (respectivement 63 et 46 % sur une année (Karathanasis, 2003)). Les résultats obtenus par l'association de plusieurs plantes améliorent les performances épuratrices du milieu. Cependant, des différences notables sont observées selon les plantes utilisées. En effet, les Fétuques épurent moins efficacement que les Typhas par rapport à ces 3 paramètres étudiés.

I.6.4/ L'épuration par l'utilisation de supports à biofilm

Certains auteurs (Jöbgen *et coll*, 2004) ont montré qu'il était possible d'éliminer le phosphore contenu dans un lac à caractère eutrophe, par immersion de supports en polypropylène sur lesquels se développe un biofilm. Après 4 mois d'immersion, les supports colonisés ont retenu environ 100 mg/m² de phosphore total.

A travers cette « synthèse bibliographique », l'intérêt des macrophytes et des biofilms semble suffisamment « se dessiner » pour envisager d'analyser comment les macrophytes et les biofilms épiphytiques associés pourraient être employés afin d'améliorer la qualité d'une eau de surface anthropisée (lac de Ribou) par des excès de P et de MO.

Le chapitre qui suit décrit les méthodes et les outils utilisés durant ces travaux.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1/ LE LAC DE RIBOU ET SON BASSIN VERSANT

Le Bassin Versant du Ribou (Figure 17) se situe à l'Est de la ville de Cholet dans le Maine-et-Loire et s'étale sur 137 km². La Figure 17 montre la localisation géographique des différentes stations qui ont été étudiées au cours de ces travaux.

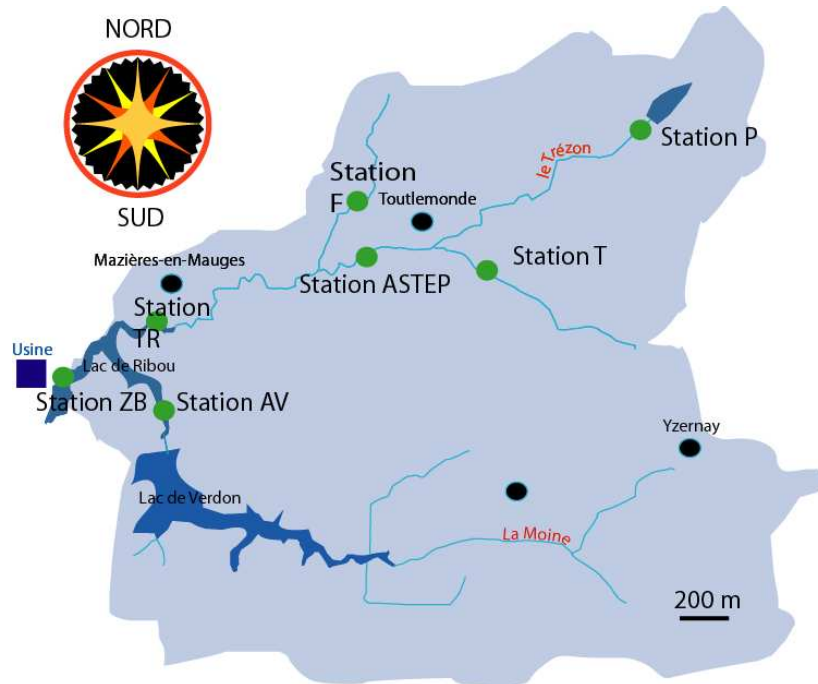


Figure 17: présentation du Bassin versant du Ribou

(Station ZB : longitude 00° 50'27''O, latitude 47°02'00''N ; Station TR : longitude 00° 49'05''O, latitude 47°02'25''N ; Station AV : longitude 00° 49'19''O, latitude 47°01'21''N ; Station ASTEP : longitude 00° 46'36''O, latitude 47°02'52''N ; Station T : longitude 00° 45'03''O, latitude 47°03'14''N ; Station P: longitude 00° 42'44''O, latitude 47°04'19''N ; Station F : longitude 00° 46'43''O, latitude 47°03'27''N)

De nombreux élevages sont présents sur le bassin versant avec 190 exploitations agricoles (220 agriculteurs) sur 9690 ha de SAU (Surface Agricole Utile). La production dominante est l'élevage bovin accompagné d'un ou plusieurs élevages « hors-sol ». Tous effectifs confondus, la charge animale est de l'ordre de 1,5 UGB/ha (Unité Gros bétail / hectare) sur tout le bassin versant. En 2003, la répartition des élevages est la suivante :

- 17200 bovins
- 4300 ovins
- 32200 porcins
- 1000000 de volailles
- 23000 lapins

Selon la directive nitrate, le bassin est classé en zone vulnérable à cause de la quantité d'effluents produits. 53 % de la SAU est labourée pour faire du maïs fourrager. Les prairies occupent 47 % des surfaces. Les activités agricoles génèrent le plus de pollution (65 % de la MO (250 T/an), 75 % de l'azote et 61 % du phosphore)

Le barrage du Ribou a été construit en 1957, au Sud-Est de Cholet sur le cours de la *Moine (rivière)* afin de répondre aux besoins en eau de la commune de Cholet. Comme le montre la Figure 18 qui met en évidence le bilan annuel moyen des apports en eaux, la capacité du lac du Ribou est de **3,2 Millions** de mètres cubes pour une superficie de **80 ha** et une profondeur maximale avoisinant **7 m (milieu du lac)**. La prise d'eau située dans la retenue alimente l'usine d'eau potable. Au milieu des années 70, la croissance des besoins en eau a nécessité la construction en 1979 d'un deuxième barrage, à l'amont de celui de Ribou. Le Verdon a une capacité de **14,6 Mm³** pour une surface de **220 ha**. Ce deuxième plan d'eau sert de réserve pour remplir la retenue du Ribou, durant la période plus sèche (mai à octobre de chaque année).

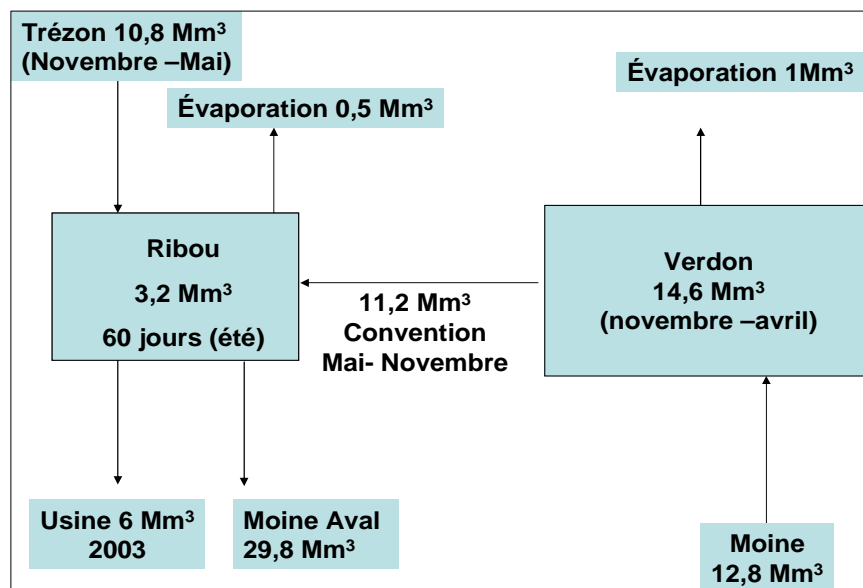


Figure 18 : Bilan annuel moyen des apports en eau (Coyne et Béliet, 1994)

Les apports annuels en eau s'effectuent par la rivière du Trézon (10,8 Mm³ d'eau) et par le verdon (11,2 Mm³ d'eau) avec une pluviométrie moyenne annuelle de **753,7 mm**. Selon les années, **20 à 40 Mm³** d'eau transitent par le lac de Ribou.

Actuellement, la capacité de traitement au niveau de l'usine est de **1500 m³/h** destinés à **16500** abonnés, soit **60200** habitants situés sur les communes de Cholet, la Tessoualle, Saint Christophe du bois et le Puy- Saint bonnet. Les volumes distribués sont de **4,1 Millions** de m³

par an dont 2,3 millions aux particuliers et 1 Millions aux industriels et le reste aux communes. 5,6 millions de m³ doivent être prélevés dont 95 % dans la retenue du Ribou et 5 % grâce au champ captant de Rucette (Sud de Cholet) composé d'une dizaine de puits d'une profondeur comprise entre 20 et 60 mètres. Les volumes d'eau issus de ces deux zones sont distribués à 8,5 % de la population du département. Elles sont alors considérées comme des zones majeures qu'il faut préserver (Aquascop, 2004).

II.2/ INVENTAIRES FLORISTIQUES PAR LA METHODE DES QUADRATS

Le taux de recouvrement des espèces est évalué à partir de quadrats pris au hasard en milieu homogène afin de valider la méthode. Ceux-ci doivent être représentatif des communautés végétales présentes sur le site. Le recouvrement de la végétation est déterminé par la projection verticale des organes aériens ou aquatiques sur le sol et est fonction de la surface considérée.

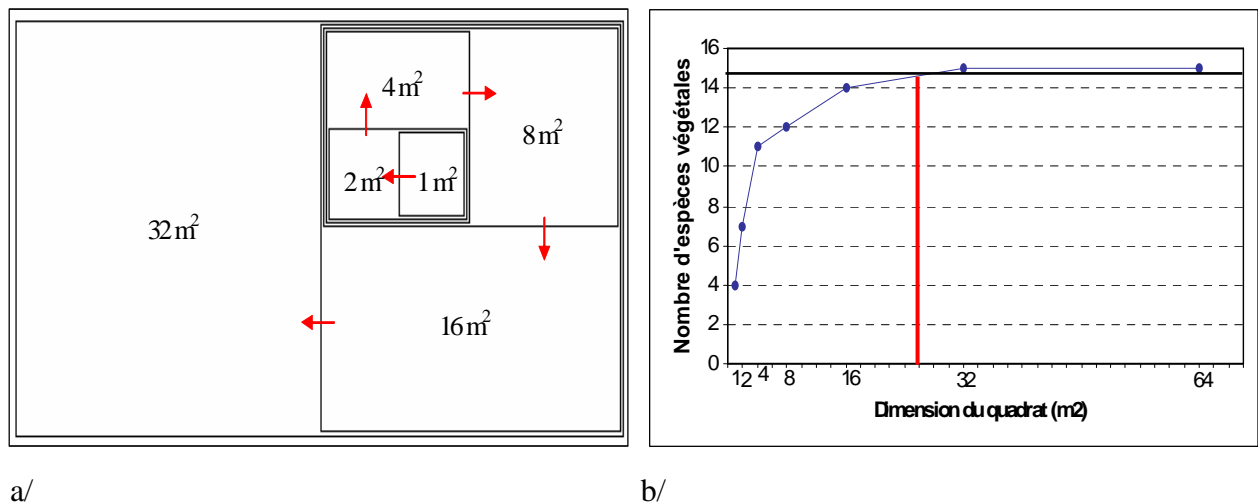


Figure 19 : a/ Détermination de l'aire minimale b/ Courbe représentant le nombre d'espèces végétales en fonction de la dimension du quadrat

La Figure 19 montre la méthode de détermination de la surface minimale requise pour réaliser les inventaires floristiques (méthode Braun-Blanquet). Pour connaître cette surface, il est nécessaire d'effectuer une succession de quadrats en doublant à chaque fois la surface (Figure 19a) et compter le nombre de nouvelles espèces présentes dans le nouveau quadrat. La courbe de l'évolution du nombre d'espèces inventoriées en fonction de la superficie (Figure 19b) permet de déterminer la surface minimale qui est obtenue au plateau de la courbe tracée (Figure 19b). Le nombre d'espèces augmente fortement au début puis atteint un plateau signifiant que toutes ces dernières ont été répertoriées (Figure 18b, trait noir).

Le taux de recouvrement de chaque espèce est réalisé à partir de la surface minimale déterminée qui est de 25 m² dans notre étude (Figure 19b, trait rouge). Afin de cartographier le taux de recouvrement selon les espèces, un code de couleur est alors attribué en fonction du recouvrement de la végétation (Tableau 10). Le vert est attribué à une absence de relevés, le blanc à une absence de végétation, le jaune à un taux de recouvrement de l'espèce inférieur à 5 % et ainsi de suite.

Tableau 10 : Code couleur en fonction du recouvrement des végétaux

+ : présence ; **I** : recouvrement ($r \leq 5\%$) ; **II** : $5\% < r \leq 25\%$; **III** : $25\% < r \leq 50\%$; **IV** : $50\% < r \leq 75\%$; **V** : $75\% < r$.

| Recouvrement (r) | Couleur associée | Recouvrement (r) | Couleur associée |
|-----------------------|------------------|----------------------------|------------------|
| Pas de relevé | | II : $5\% < r \leq 25\%$ | |
| Absence de végétation | | III : $25\% < r \leq 50\%$ | |
| + : présence | | IV : $50\% < r \leq 75\%$ | |
| I : $r \leq 5\%$ | | V : $75\% < r$ | |

II.3/ OUTILS D'ANALYSES DE SURFACE : MEB ET EDX POUR L'ETUDE DES BIOFILMS

II.3.1/ Préparation des échantillons

Dans un premier temps, il est nécessaire de préparer une solution de glutaraldéhyde avant de se rendre sur le terrain pour le prélèvement des échantillons à observer.

La solution de glutaraldéhyde à un rôle fixateur, il permet de conserver les échantillons dans le milieu d'origine. A partir d'une solution de glutaraldéhyde à 25 %, 50 ml de solution de glutaraldéhyde à 4% est préparé avec de l'eau du Lac de Ribou préalablement filtrée à l'aide de filtres millipores (0,45 µm). L'utilisation de ces filtres permet d'éliminer les particules en suspension et les bactéries présentes dans l'eau, ce qui empêche les biais dans les échantillons observés par microscopie électronique à balayage (MEB). Ensuite, les échantillons sont prélevés sur le terrain. Ils proviennent d'un tissu végétal directement en contact avec l'eau du lac (feuilles, tiges). Rapidement, le tissu prélevé est immergé dans la solution de glutaraldéhyde fraîchement préparée (dans une boîte de Pétri). Puis, ce tissu est

coupé à l'aide d'une lame de rasoir de manière à avoir une coupure nette et de façon à ne pas « écraser » ou déformer les échantillons qui doivent être observés au MEB. 3 à 5 échantillons avec du biofilm mesurant quelques millimètres, sont ensuite rapidement transférés dans un tube plastique contenant la solution de glutaraldéhyde (fixer les structures cellulaires). Les tubes sont ensuite placés dans une cloche à vide et laissés 2 heures (sous vide). Cela permet d'enlever l'air restant au contact de l'échantillon. Cet échantillon est alors retiré et mis en suspension dans l'eau du lac préalablement filtrée. A ce stade de la préparation, ils peuvent être conservés 15 jours au réfrigérateur à 4 °C.

Les échantillons vont ensuite subir une succession de traitements pour permettre leurs observations au MEB :

- A partir d'une solution de tétr oxyde d'osmium (OsO_4 à 4%), une solution à 2% est préparée. Cette dernière est composée de 50% d'eau du lac de Ribou et 50% OsO_4 à 4%. L'échantillon est immergé dans cette solution à 2%. Le tétr oxyde d'osmium permet de rendre l'échantillon plus conducteur.
- Après avoir enlevé le tétr oxyde d'osmium, puis lavé avec de l'eau déminéralisée (3 x 10 min.), l'échantillon est ensuite déshydraté avec une solution d'éthanol 50% (20 min.), puis à 70% (20 min.), 90% (20 min.) et à 100% (4 x 20 min.).

L'échantillon est traité avec du HMDS (Hexaméthylidisilane, $[(\text{CH}_3)_6\text{Si}_2\text{NH}]$). Ce traitement va permettre le maintien des structures cellulaires grâce à la silice. Le traitement est effectué en 3 étapes : - dans le tube : > 50% éthanol et 50% HMDS, pendant 15 minutes

> 25% éthanol et 75% HMDS, pendant 15 minutes

- dans une coupelle : 100% HMDS, une nuit

Le traitement à l'HMDS correspond à l'étape de dessiccation. Après le passage de l'échantillon dans le HMDS, il est laissé une nuit à température ambiante.

Et enfin, l'étape de métallisation au carbone pendant 30s permet de le rendre conducteur afin de préparer l'étape d'observation.

II.3.2/ Observation des biofilms épiphytiques au MEB

L'échantillon peut maintenant être observé au MEB, avec une faible énergie de faisceau (FESEM) inférieure ou égale à 3 keV afin de ne pas détériorer sa surface. Ce sont les électrons secondaires qui sont analysés pour permettre les observations d'un échantillon.

II.3.3/ MEB – Analyses chimiques des biofilms par Microanalyse EDX

Un faisceau de 20 keV est envoyé sur l'échantillon à analyser. Les électrons présents dans le cœur de la matière sont éjectés. La désexcitation de l'atome ainsi ionisé se fait par une transition d'un électron vers les orbitales ayant préalablement perdu leurs électrons. Ce processus libère un photon X caractéristique des éléments chimiques considérés. Ces photons sont alors analysés. Par cette méthode, une étude semi-quantitative entre chaque élément contenu dans les biofilms peut être effectuée ainsi que la réalisation de cartographie permettant d'étudier la répartition de chaque élément chimique (Hiernaux, 2005).

A chaque campagne, 3 à 5 échantillons (végétaux, supports bambous, plastiques) sont prélevés sur chaque site et séchés à l'air pour mettre en évidence les proportions entre tous les éléments chimiques du biofilm. Pour la cartographie par élément, 1 à 2 échantillons sont traités au glutaraldéhyde à 4 % puis laissés sous vide pendant 2h avant de subir uniquement une étape de déshydratation à l'éthanol.

II.4/ DENOMBREMENTS D'ALGUES, DE DIATOMÉES ET DE CYANOBACTERIES

La Figure 20 décrit le protocole de dénombrements du phytoplancton dans l'eau et au sein du biofilm. Lors de chaque dénombrement, nous distinguerons les algues des diatomées car les conditions de croissance entre ces deux taxons sont différentes bien que les diatomées soient des algues.

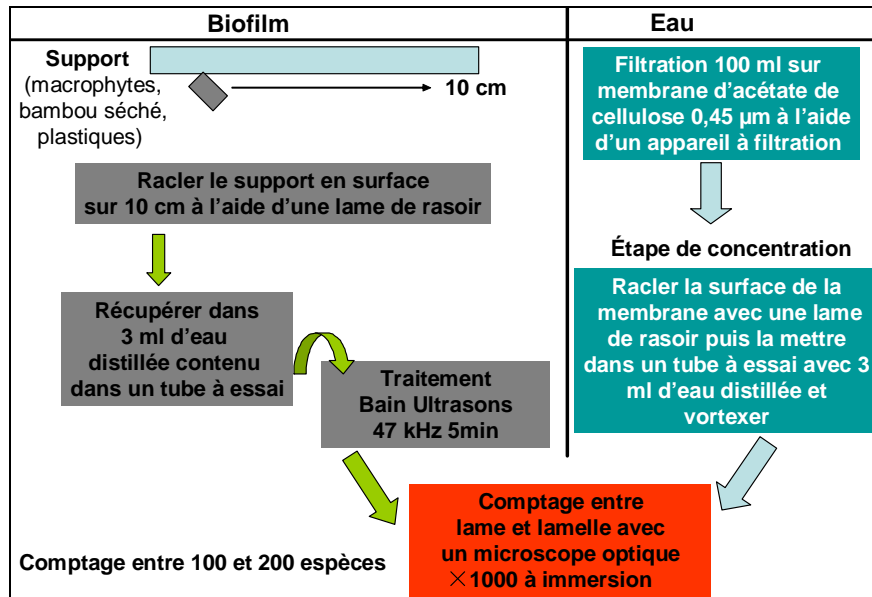


Figure 20: Dénombrements des algues et cyanobactéries en suspension et au sein du biofilm

- **Dans l'eau :**

- **Étape de concentration :** un volume de 100 mL d'eau est filtré sur membrane d'acétate de cellulose de diamètre 0,45 µm placé sur un module de filtration. L'aspiration est effectuée à l'aide d'une pompe à vide. la population algale et les cyanobactéries contenues dans l'eau étudiée sont ainsi récupérées. La membrane est mise dans un tube à essai contenant 3 mL d'eau stérile avant d'agiter l'ensemble à l'aide d'un vortex.
- **Dénombrement :** une goutte du concentrât est déposé entre lame et lamelle pour être observé au microscope optique (grossissement 1000, à l'immersion). Sur 100 individus comptés, des proportions sont alors établies entre diatomées, algues et cyanobactéries. L'opération est répétée deux fois.

- **Au sein du biofilm :**

- **Étape de décrochage du biofilm :** le biofilm est récupéré « en frottant » méticuleusement à l'aide d'une lame de rasoir stérile, la surface du support (macrophytes, bambous, plastiques) sur 10 cm. Le biofilm est mis en suspension dans 5 ml d'eau stérile puis un traitement par les ultrasons pendant 5 min à 47 kHz est préconisé dans le but de dissocier les amas visibles à l'œil nu.
- **Dénombrement :** comme décrit précédemment

- **Bambous**

Des bambous de diamètre $0,8 \pm 1$ mm de taille moyenne de 30 cm sont installés en zone immergée au niveau des stations ZB, AV, TR, ASTEP et T.

Tous les 15 ± 1 jours, un bambou est prélevé afin de caractériser le biofilm (dénombrement phytoplancton, observation MEB, microanalyse EDX). Les autres supports sont laissés dans l'eau afin d'obtenir un temps de contact plus long. Cette approche permet de suivre l'évolution du biofilm au cours du temps en considérant que la colonisation sur tous les bambous est similaire pour un milieu donné et caractéristique de la composition de l'eau.

- Supports plastiques

Des supports plastiques de diamètre $0,7 \pm 1$ mm de taille moyenne de 30 cm sont installés uniquement au niveau de la station ZB en même temps que les bambous (14 Avril 2007).

II.5/ ETUDE DES BIOFILMS ELABORES EN LABORATOIRE

II.5.1/ Schéma de montage du bioréacteur à billes de verres

La Figure 21 représente le montage mis en œuvre pour élaborer des biofilms en laboratoire à partir d'eaux naturelles (environ 80 L d'eau sont passés dans le bioréacteur). Les eaux sont prélevées in situ et stockées dans une chambre froide à 4°C.

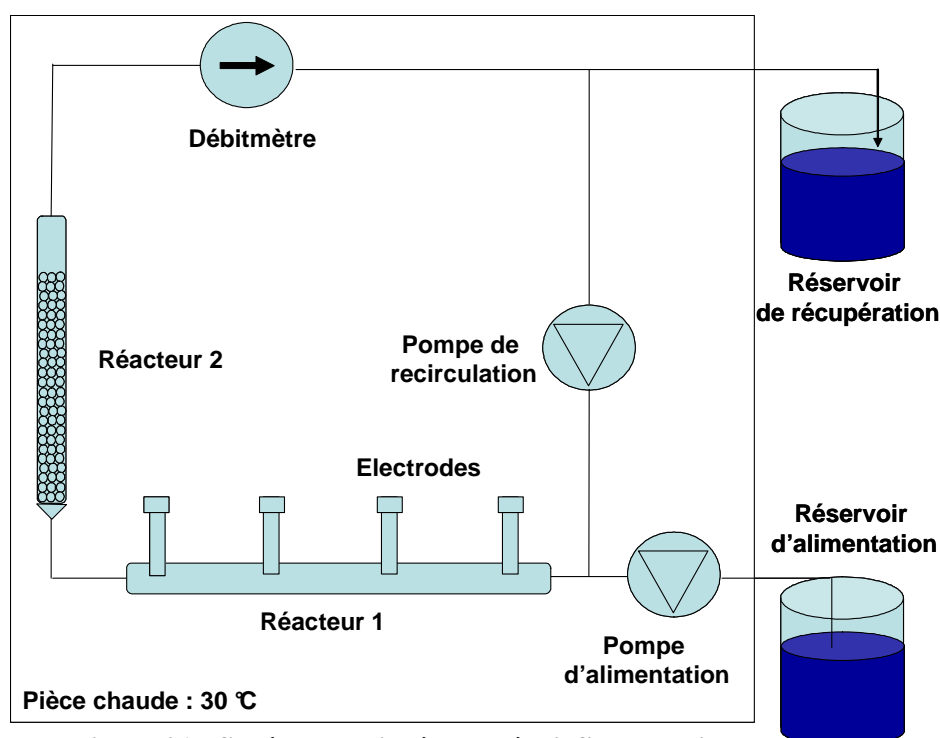


Figure 21 : Schéma du bioréacteur à biofilm sur billes de verres

Le montage est composé :

- D'un réacteur 1 de 360 cm³ (longueur : 51 cm, diamètre : 3 cm) munie d'électrodes pour effectuer les mesures d'épaisseurs au cours du temps.
- D'un réacteur 2 de 227 cm³ (hauteur : 25 cm, diamètre : 3,4 cm) contenant 1100 billes (diamètre : 5 mm) de verres soit une surface de 863 cm², ce qui fait un volume total de billes de 72 cm³, dans lequel se constitue le biofilm. Le débit d'alimentation est de 280 cm³/h et le temps de séjour hydraulique qui est de 2,3 h correspond au volume du réacteur divisé par le débit. La température de l'eau est proche de la température de l'incubateur qui est maintenue entre 28 et 30 °C.
- D'une pompe permettant le prélèvement de l'eau alimentation
- D'une pompe assurant une recirculation de la même eau au sein du montage (débit de recirculation : 11 L/min).
- D'un débitmètre situé à la sortie du deuxième réacteur permettant de mesurer le débit de recirculation.
- Les réservoirs situés à l'extérieur de l'enceinte close sont exposés à température ambiante (18-20°C). Un réservoir contient l'eau d'alimentation du réacteur et l'autre réservoir permet de recueillir l'eau de sortie. Les prélèvements d'eau sont effectués sur l'eau d'alimentation ou d'entrée (1), l'eau accumulée dans le réservoir de sortie « récupération » (2) et directement à la sortie du réacteur (3).

II.5.2/ Protocole de décrochage des biofilms

Le biofilm préalablement constitué sur des billes de verre est mis en suspension dans un bécher contenant 200 mL d'eau ultrapure. L'ensemble est traité par les ultrasons réglés à 60 W pendant 3 min pour les analyses biologiques (biologs) et 2 fois 3 min pour toutes les analyses chimiques avec 1 temps de repos de 5 min entre 2 phases de traitements afin d'éviter un échauffement important de la suspension. Pour le dénombrement algal, la durée de traitement est de 1 min pour éviter de détériorer les différentes espèces présentes dans le biofilm.

II.5.3/ Suivis des paramètres physico-chimiques

Les tableaux 11 et 12 montrent respectivement les analyses physico-chimiques réalisées dans les eaux d'alimentations, de sorties et de récupérations, puis dans les biofilms, avec les outils mis en œuvre pour effectuer toutes ces analyses.

Tableau 11 : Analyses physico-chimiques effectuées dans l'eau d'alimentation et de récupération (les eaux brutes sont décantées)

| | Echantillons | Outils analytiques | Normes |
|-------------------------|---------------|------------------------------------|-------------|
| pH | Eaux brutes | WTW Multi 340i | |
| Conductivité (µS/cm) | Eaux brutes | WTW Multi 340i | |
| Turbidité (NTU) | Eaux brutes | HACH Ratio Turbidimeter | NF T 90-033 |
| COT (mg/L) | Eaux brutes | SHIMADZU TOC-Vcsh | NF T 90-102 |
| COD (mg/L) | Eaux filtrées | SHIMADZU TOC-Vcsh | NF T 90-103 |
| Azote total (mg/L) | Eaux brutes | SHIMADZU TOC TNM-1-Vcsh | |
| Azote dissous (mg/L) | Eaux filtrées | SHIMADZU TOC TNM-1-Vcsh | |
| Calcium mg/L | Eaux brutes | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Magnésium (mg/L) | Eaux brutes | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Fer (µg/L) | Eaux brutes | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Manganèse (µg/L) | Eaux brutes | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Aluminium (µg/L) | Eaux brutes | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Potassium (mg/L) | Eaux brutes | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Sodium (mg/L) | Eaux brutes | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Silicium (mg/L) | Eaux brutes | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Phosphore (µg/L) | Eaux brutes | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Fluorophores A, C, T, B | Eaux filtrées | Fluorimètre Fluorimax-2 | |

Eaux filtrées : Eaux filtrées sur filtre 0,22 µm à l'aide d'une seringue en verre

Tableau 12 : Analyses physico-chimiques effectuées pour l'étude du biofilm (mis en suspension dans l'EUP).

| | Biofilms (200ml) | Outils analytiques | Normes |
|----------------------|----------------------------|------------------------------------|-------------|
| COT (mg/L) | Suspensions | SHIMADZU TOC-Vcsh | NF T 90-102 |
| COD (mg/L) | Suspensions filtrées | SHIMADZU TOC-Vcsh | NF T 90-103 |
| Azote total (mg/L) | Suspensions | SHIMADZU TOC TNM-1-Vcsh | |
| Azote dissous (mg/L) | Suspensions filtrées | SHIMADZU TOC TNM-1-Vcsh | |
| Calcium mg/L | Suspensions minéralisation | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Magnésium (mg/L) | Suspensions minéralisation | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Fer (µg/L) | Suspensions minéralisation | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Manganèse (µg/L) | Suspensions minéralisation | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Aluminium (µg/L) | Suspensions minéralisation | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Potassium (mg/L) | Suspensions minéralisation | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Sodium (mg/L) | Suspensions minéralisation | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Silicium (mg/L) | Suspensions minéralisation | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Phosphore (µg/L) | Suspensions minéralisation | ICP-OES Perkin Elmer Optima 4300DV | |
| Fluorophores | Suspensions brutes | Fluorimètre Fluorimax-2 | |

Suspensions filtrées : Suspensions filtrées sur filtre 0,22 µm à l'aide d'une seringue en verre

II.5.4/ Détermination des épaisseurs de biofilms par des mesures électrochimiques (Forêt et coll, 2006)

Les capteurs de platine ayant un diamètre de 2 mm ou 5 mm sont immergés dans l'eau naturelle qui circule dans le bioréacteur (Figure 21). Tous les 2 à 3 jours, ces derniers sont prélevés afin de suivre la formation des biofilms par mesures électrochimiques. Cette technique repose sur des mesures d'intensités en fonction d'une vitesse de rotation (variant de 300 à 800 rpm) de l'électrode tournante sur laquelle est fixée le capteur à biofilm. Le courant

limite de diffusion sur une électrode tournante est donné par l'équation 2 selon la loi de Levich.

$$iL = 0,62 \times n \times F \times S \times D^{2/3} \times \nu^{-1/6} \sqrt{\frac{2\pi}{60}} \times \Omega^{1/2} \times C_{\text{solution}} \quad \text{ou} \quad iL = K \times \Omega^{1/2} \quad \text{Equation 2}$$

n : Nombre de Faraday (96500 C/mol), S : Surface de l'électrode (m^2), D : coefficient de diffusion de la solution (m^2/s), ν : viscosité cinématique ($10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$), Ω : Vitesse de rotation (tr/min), C_{solution} : Concentration de l'espèce active (mol/m^3), iL : Courant de Levich (A).

En présence d'une couche poreuse, le courant diminue (i avec biofilm) en faisant intervenir un coefficient de diffusion (Df) lié à cette couche. Le coefficient de diffusion à travers la couche poreuse (biofilm) est considéré identique au coefficient de diffusion dans l'électrolyte car le biofilm contient plus de 95 % d'eau par conséquent, $D \sim Df$ (Forêt et coll, 2006).

La Figure 22 montre les intensités en fonction de la vitesse de rotation avec biofilm et sans biofilm au niveau des capteurs.

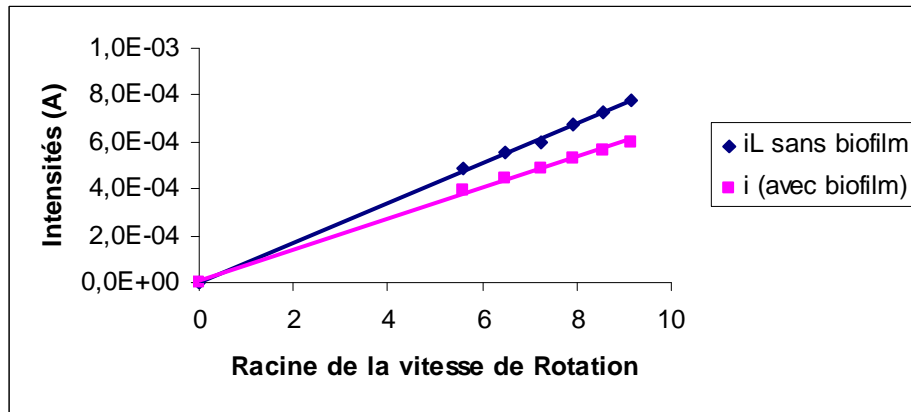


Figure 22: Intensités en fonction de la vitesse de Rotation

L'intensité i mesuré en présence de biofilm dépend de l'épaisseur de la couche de diffusion sans biofilm δL sur laquelle s'ajoute une couche de diffusion avec biofilm (δf). Le courant diffusionnel au niveau du biofilm est noté if qui est inversement proportionnel à son épaisseur (Equation 3).

$$if = \frac{n \times F \times S \times Df \times C_{\text{solution}}}{\delta f} \quad \text{Equation 3}$$

$$iL = \frac{n \times F \times S \times D \times C_{\text{solution}}}{\delta L} \quad \text{Equation 4}$$

A l'aide des équations 4 et 5, il est possible de déterminer le courant mesuré en présence de biofilm (Equation 5).

$$i = \frac{1}{(if^{-1} + iL^{-1})} \quad \text{Equation 5}$$

δf : Epaisseur de la couche poreuse, i : Intensité de courant mesurée.

Il existe une relation entre l'épaisseur du biofilm et l'intensité du courant donnée par l'équation 7. En effectuant une mesure d'intensité à partir d'un capteur sans biofilm (iL) et une mesure d'intensité à partir de ce même capteur sur lequel le biofilm s'est développé (i), l'équation 7 permet de déterminer une épaisseur moyenne de biofilm pour un temps donné (couche poreuse).

$$\delta f = n \times F \times S \times D \times C_{\infty} \times (i^{-1} - iL^{-1}) \quad \text{Equation 6}$$

L'ensemble est relié à un module CTV 101 qui assure la rotation de l'électrode. Par la suite, une série de mesures d'intensités est réalisé à différentes vitesses de rotation allant de 300 à 800 rpm et à un potentiel fixé à -0,05 V qui correspond au palier de diffusion de l'électrolyte. Ce dernier est constitué d'une solution de potassium ferrocyanide (II) trihydraté à 0,01 M et d'une solution de potassium hexacyanoferrate (III) à 0,01 M contenant 1M de KCl (Forêt, 2006).

NB : Pour effectuer chaque mesure, les capteurs récupérés au niveau du bioréacteur sont placés dans un bécher contenant de l'eau naturelle qui est utilisée pour l'élaboration du biofilm afin d'éviter le dessèchement de ce dernier.

La Figure 23 représente le montage utilisé pour effectuer les mesures électrochimiques

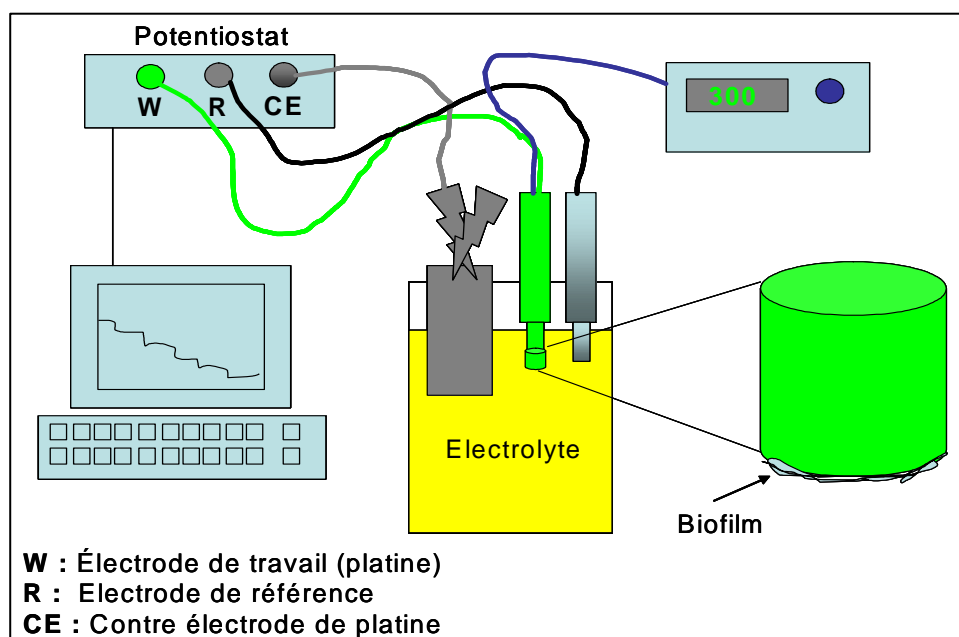


Figure 23 : Schéma de montage des mesures d'intensités en fonction des vitesses de rotation

Le montage réalisé ci-dessus comprend 3 électrodes :

- Une électrode de travail en platine (capteur à biofilm),
- Une électrode de référence (calomel saturé),
- Une contre électrode de platine.

Toutes ces électrodes sont reliées à un potentiostat connecté à un PC d'acquisition des données. La détermination des épaisseurs à partir des mesures d'intensités, est effectuée en appliquant la loi de Levich qui met en relation l'intensité mesurée, la vitesse de rotation et l'épaisseur du biofilm.

II.5.5/ Dosage du COT, COD, Azote total et dissous

L'analyseur de carbone utilisés est un Shimadzu TOC-V CSH et met en œuvre un procédé d'oxydation catalytique et thermique. La température du four est de 680°C et le catalyseur est à la base de platine (laine de platine imprégnée sur laine de Quartz). La solution est préalablement acidifiée (acide nitrique) afin de transformer la carbone minéral en dioxyde de carbone. Après barbotage pendant 10 min le CO₂ est chassé puis le carbone organique est oxydé en CO₂. Le gaz vecteur contenant les produits de combustion passe à travers un piège à halogène. Le CO₂ est alors quantifié à l'aide d'un détecteur infrarouge non dispersif.

Le carbone organique total (COT) est directement dosé à partir des eaux brutes alors que pour doser le carbone organique dissous (COD) il est nécessaire de filtrer l'eau brute sur 0,22 μm .

Les analyses d'azote total ont été conduites avec l'analyseur de carbone organique Shimadzu TOC-V CSH équipé d'un module à azote total TNM-1. L'analyse repose sur l'oxydation catalytique à 680°C des composés azotés sous forme de NO_x (x = 1 ou 2) suivi de leur détection par chimiluminescence. La limite de détection est de l'ordre 15 $\mu\text{g/L}$. Cet appareil permet de quantifier les formes organiques et minérales. L'étalonnage de l'appareil est réalisé avec une solution d'acétanilide. Les échantillons sont dosés 3 fois puis une moyenne arithmétique est réalisée.

II.5.6/ Analyse de la MO par fluorimétrie 3D et pyrolyse GC-MS

Fluorimétrie 3D :

Cette étude est réalisée à l'aide d'un fluorimètre Fluorimax-2 sur des échantillons d'eau préalablement filtrée sur 0,22 μm (matière organique dissoute). Une matrice de fluorescence Emission-Excitation est obtenue après 51 scans (Figure 24).

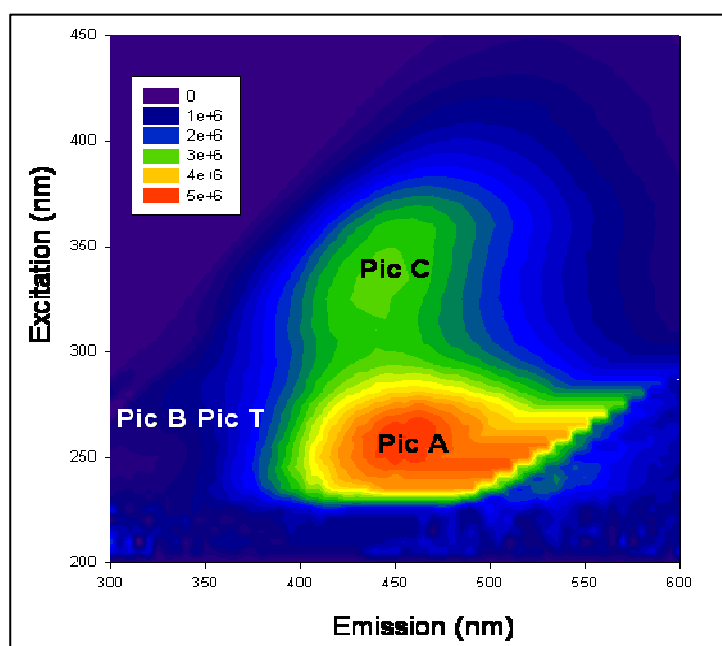


Figure 24 : Matrice de fluorescence type d'une eau douce filtrée sur 0,22 μm obtenue à l'aide du logiciel Sigma plot.

L'intensité de fluorescence est mesurée pour des longueurs d'ondes d'excitation variant de 200 à 450 nm et des longueurs d'ondes d'émission variant de 300 à 600 nm. Pour s'affranchir des interférences liées à l'eau, il est nécessaire de soustraire le spectre de l'échantillon avec le spectre obtenu avec de l'eau ultrapure. Globalement, sur des eaux naturelles filtrées, 2 fluorophores apparaissent (Figure 24) : le pic A et le pic C correspondant

à des matières humiques d'origines terrestres. Les pics B (type tyrosine) et T (type tryptophane) correspondent à des sous produits microbiens et sont considérés plus généralement comme des marqueurs de l'activité biologique.

Pyrolyse GC-MS :

La méthode de pyrolyse est réalisée en laboratoire selon la méthode décrite par Bruchet en 1985. L'unité de pyrolyse est connectée à un chromatographe à phase gaz G1800A GCD System (Hewlett-Packard) couplé à un spectromètre de masse. Cette méthode consiste à placer quelques milligrammes d'extraits de matière lyophilisée dans un tube en quartz et à pyrolyser à 650°C pendant 20 secondes avec une montée en température de 20°C/ms obtenue grâce à un appareil pyroprobe 2000 (Chemical Data Systems, Oxford, Pa). La séparation des sous-produits de pyrolyse s'effectue dans une colonne capillaire SGE ID-BP 20 polaire de dimension 30 × 0,25 mm et un débit de gaz vecteur, Hélium 6 Messer, de 1 mL/min. La programmation de température varie de 50°C à 250°C, à une vitesse de 3°C par minute. La détection s'effectue par ionisation d'électrons détectant des masses allant de 40 à 425 m/z. Les spectres sont traités à l'aide du logiciel GCD Software et d'une base de données de spectre de masse. Sur les pyrochromatogrammes issus de l'analyse des MOD et des biofilms sont représentés les sous-produits de pyrolyse sous forme de pics, que l'on peut attribuer à une famille (sucres, protéines, lipides). Pour l'étude des biofilms, l'interprétation semi-quantitative des chromatogrammes est obtenue par la détermination des aires des principaux pics identifiés sur l'aire totale de tous ces pics.

II.5.7/ Fractionnement de la MO sur résine XAD-4 et XAD-8

Les matières organiques dissoutes sont fractionnées par passage sur des résines XAD-8 (ester acrylique) et XAD-4 (styrène divinylbenzène) comme le montre la Figure 25.

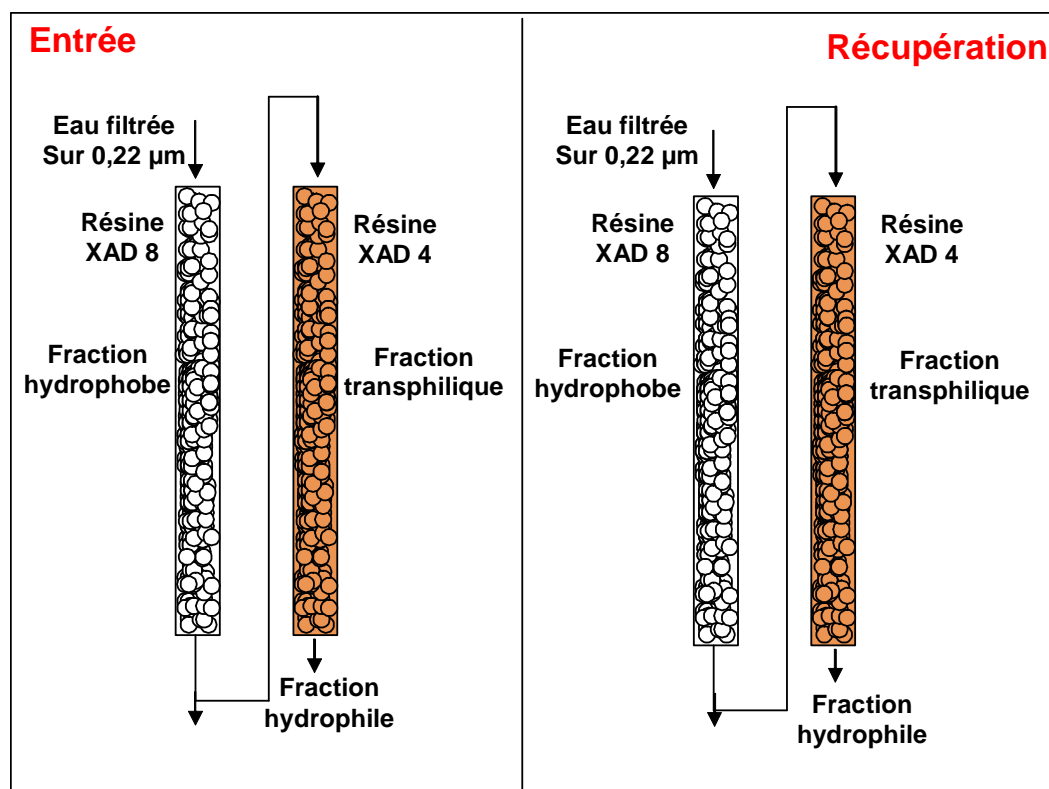


Figure 25 : Protocole d'extraction de la matière organique dissoute à l'aide des résines XAD 8 et XAD 4

Dans un premier temps les eaux sont filtrées sur 0,22 µm afin d'enlever le carbone particulaire puis acidifiée avec quelques gouttes de HCl à 12 M jusqu'à l'obtention d'un pH proche de 2. Ensuite, un passage sur résine XAD-8 (25 mL de résine) du filtrat permet de retenir les fractions hydrophobes suivi d'un passage sur résine XAD-4 (25 mL de résine) afin de séparer les fractions transphiliques des fractions hydrophiles. Ainsi, des mesures de COD sont réalisées sur les eaux de sortie de chaque colonne. Ce protocole est appliqué sur les eaux d'alimentation (150 ml) et sur les eaux de récupération c'est à dire après passage au sein du bioréacteur (150 ml) après 10 jours de colonisation. Le débit est fixé à 1 mL/min au niveau de chaque colonne. Le fractionnement des eaux est alors appliqué en parallèle dans les mêmes conditions opératoires pour les eaux d'alimentation et de récupération afin de mettre en évidence des différences notables au niveau de la composition en carbone des eaux filtrées non fractionnées, des eaux sans la fraction hydrophobe (transphilique + hydrophile) et des fractions HPI seules. Les analyses suivantes sont réalisées sur les eaux fractionnées : le COD, l'azote dissous et la fluorimétrie 3D. Les résines sont régénérées par passage au goutte à goutte d'une solution de HCl à 0,1 N dans les colonnes (environ 2 L) suivi d'une solution de NaOH à 0,1 N (environ 2 L). A l'issue de la régénération des résines, une mesure de COD en sortie de colonnes est réalisée afin de vérifier si ces dernières ont été bien régénérées.

Filtration sur 300 mL de résines XAD-8 et XAD-4 pour l'analyse de la MOD par pyrolyse CG-SM.

Dans un premier temps, il est nécessaire de filtrer sur une cartouche Polygard CR (membrane Millipore en polypropylène, seuil de coupure 10 μm) environ 40 L d'eau pour éliminer les grosses molécules, puis sur une cartouche Milligard (membrane Millipore en ester de cellulose (seuil de coupure 0,45 μm) afin de ne conserver que la partie dissoute. Ce protocole est appliqué sur l'eau prélevée au niveau de la station AV qui sert à alimenter le bioréacteur, et aussi sur les 2 derniers réservoirs de récupération (après passage dans le bioréacteur) contenant environ 20 L d'eau chacun. Les eaux sont acidifiées avec de l'acide chlorydrique concentré (12 M) afin d'obtenir un pH proche de 2. A pH acide, la matière organique a plus d'affinité avec la résine. Le protocole de fractionnement est similaire que précédemment avec un débit de 30 ml/min. Durant l'étape de filtration sur les résines, le COD est vérifié en sortie de chaque colonne. En fin d'expériences, un protocole d'extraction de la matière organique absorbée sur les résines est mis en œuvre. Dans un premier temps, le rinçage des résines a été effectué avec un volume d'acide formique à pH 2 (force éluante plus faible que l'eau ultrapure) correspondant à 4 fois le volume mort de la résine. Cette étape a pour objectif d'éliminer les minéraux retenus dans les colonnes. Les matières organiques sont alors éluées avec un mélange d'acétonitrile/eau (75 %/25 %). Une étape d'évaporation sous vide permet d'éliminer l'acétonitrile puis les échantillons sont congelés à -20°C avant d'être lyophilisés.

II.5.8/ Minéralisation des biofilms pour le dosage des métaux

A partir de la suspension traitée par les ultrasons (200 mL), 3 mL sont prélevées dans un tube à essai dans lequel sont ajoutés 2 mL d'acide nitrique et 500 μl d'eau oxygénée. Le tube à essai est placé dans un minéraliseur et chauffé à 100°C pendant 2h. Après minéralisation, le volume restant dans le tube à essai contient l'ensemble des métaux initialement présent dans le volume de 3 mL. L'ensemble est mis en solution dans 25 mL d'eau ultrapure.

II.5.9/ Dosages des minéraux et du P par ICP-OEP

Le dosage des métaux est réalisé par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy) en entrée, en sortie du bioréacteur et également au sein du biofilm préalablement décroché des supports en billes de verre et mis en suspension par sonication puis suivi d'une étape de minéralisation. Les dosages élémentaires sont réalisés selon la norme AFNOR NF EN ISO 11885 à l'aide d'un spectromètre Perkin Elmer Optima 4300 DV équipé d'un générateur haute fréquence (40 MHz, Puissance maximale de 1500 W) et utilisant un nébuliseur de type concentrique (Meinhard) et une chambre de nébulisation cyclonique.

Cette méthode permet le dosage des métaux à l'état de trace. Les échantillons à analyser sont introduits à l'aide d'une pompe péristaltique dans une chambre de vaporisation où il est transformé en un aérosol de très fines gouttelettes avec de l'argon gazeux. L'aérosol ainsi formé est envoyé dans un plasma d'argon à très haute température (entre 6000 et 10000 °C) dans le but d'ioniser complètement la plupart des éléments. Un vide différentiel accélère les ions du plasma vers un ensemble de lentilles électrostatiques qui extrait les ions positivement et les transporte vers un filtre de masse quadripolaire. Ce filtre transmet seulement les ions présentant un rapport masse sur charge particulier, déterminé en fonction de la fréquence appliquée au quadripôle. Un détecteur d'ions enregistre alors les ions transmis. Pour un isotope donné, le nombre d'ions mesuré permet de calculer directement la concentration de l'élément analysé grâce à un logiciel permettant le traitement quantitatif et qualitatif de l'enregistrement.

Les échantillons d'eau sont acidifiés avec 2 gouttes d'acide nitrique et conservées à 4°C. Les échantillons de biofilms préalablement minéralisés sont alors récupérés dans un volume connu (qsp 25 mL) d'eau ultrapure avant de doser les différents éléments chimiques.

II.5.10/ Détermination des teneurs en élément chimique X dans les biofilms

La détermination de la teneur de chaque élément chimique X s'effectue à partir de l'équation 7.

$$T_x = \frac{[x] \times V_r \times V_b}{V_m \times S} \quad \text{Equation 7}$$

avec : - T_x : Teneur en élément x dans le biofilm en ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$).

- $[x]$: Concentration de l'élément X contenue dans un volume V_r d'échantillon à doser.

- V_r : Volume d'échantillon dans lequel est placé le minéralisat et dosé par ICP-OES ($V_r = 25$ mL).

- V_b : Volume dans lequel est récupéré le biofilm élaboré sur l'ensemble des billes de verre (0,2 L).
- V_m : Volume de suspension de biofilm (mL) prélevé dans 0,2 L pour le dosage des éléments X (3ml).
- S : Surface totale des billes en cm^2

II.5.11/ Suivis des paramètres microbiologiques

II.5.11.1/ Dénombrements d'algues, de diatomées et de cyanobactéries

Dans l'eau

La membrane est placée entre le fritté et le support gradué. La filtration est alors réalisée à l'aide d'une pompe permettant d'assurer le vide (Figure 26). L'eau naturelle est filtrée (100 ml) sur membrane de nitrate de cellulose ayant un diamètre de pore de $0,45 \mu\text{m}$. La Figure 26 montre le module de filtration utilisé.

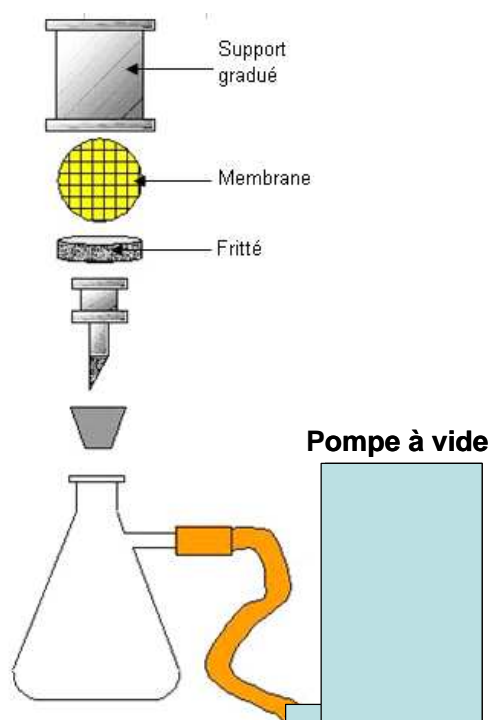


Figure 26 : Module de filtration frontale mis au point au laboratoire

La membrane est récupérée dans un tube à essai contenant 3 mL d'eau physiologique stérile. L'ensemble est placé sous agitation à l'aide d'un vortex afin de décrocher les microorganismes (algues, diatomées et les cyanobactéries) présents sur la membrane. Cette étape préalable de filtration et de resuspension est nécessaire pour concentrer les microorganismes. Par la suite, une goutte du concentrât est déposée entre lame et lamelle afin

de réaliser le comptage des espèces en microscopie optique (Grossissement : x 1000 pour dénombrer le phytoplancton et les cyanobactéries). Les résultats obtenus sont exprimés en nombre d'individus ramené à un pourcentage relatif entre les algues, les diatomées et les cyanobactéries. Le comptage a été réalisé sur 100 espèces regroupant ces trois grandes « familles » toutes confondues.

Dans les biofilms

Le dénombrement est directement effectué à partir d'une goutte de suspension de biofilm traité par les ultrasons (1 min, 60 W).

NB : Pour chaque échantillon, tous les dénombrements ont été réalisés en triple.

II.5.11.2/ Détermination de la population totale en bactéries

Le nombre de bactéries est compté à l'aide d'une cellule de Thoma (Figure 27).

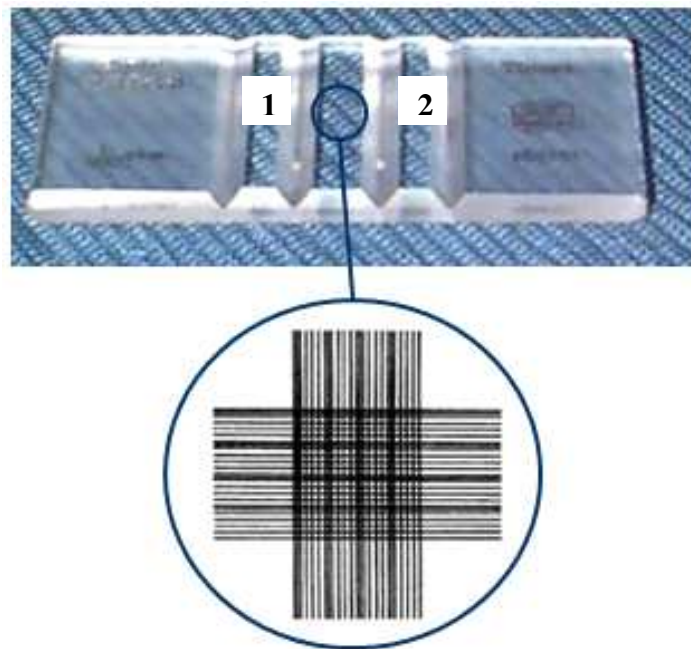


Figure 27 : La cellule de Thoma

Les deux parties (notées 1 et 2 (Figure 27)) sont humidifiées avec un peu d'eau pour « coller » la lamelle. Puis, un inoculum (eaux ou biofilms remis en suspension et traités par ultrasons) de 10 μl est déposé entre lame et lamelle, en prenant soin de ne pas décoller cette dernière. L'ensemble est placé sous un microscope optique (x 400) de telle sorte à faire la mise au point au niveau du quadrillage gravé sur la cellule et composé de 16 carrés. Chaque carré représente un volume de $1/250 \text{ mm}^3$. Le comptage de bactéries est alors réalisé sur plusieurs carrés (10) afin d'être le plus précis possible. De plus, cette opération est répétée plusieurs fois (3-4) pour

une même eau afin d'obtenir une valeur fiable. L'équation 8 permet de déterminer le nombre de bactéries par ml.

$$N = \frac{25 \times n \times 1000}{x} \quad \text{Equation 8}$$

n : nombre de bactéries comptées

x : nombre de carrés sur lesquels ont été réalisés les dénombrements

N : nombre de bactéries/ml

II.5.11.3/ Détermination des profils métaboliques des communautés de microorganismes présentes dans les eaux et les biofilms par biolog GN2.

Les biologs GN2 permettent d'étudier le profil métabolique des communautés microbiennes présentes dans les eaux naturelles. Ils se présentent sous forme de microplaques composées de 96 puits contenant chacun une source carbonée (Figure 28) que l'on peut intégrer dans une famille.

| | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--|
| A1 Water | A2 α-Cyclodextrin | A3 Dextrin | A4 Glycogen | A5 Tween 40 | A6 Tween 80 | A7 N-Acetyl-D-Galactosamine | A8 N-Acetyl-D-Glucosamine | A9 Adonitol | A10 L-Arabinose | A11 D-Arabitol | A12 D-Cellobiose |
| B1 i-Erythritol | B2 D-Fructose | B3 L-Fucose | B4 D-Galactose | B5 Gentiobiose | B6 α-D-Glucose | B7 m-Inositol | B8 α-D-Lactose | B9 Lactulose | B10 Maltose | B11 D-Mannitol | B12 D-Mannose |
| C1 D-Melibiose | C2 β-Methyl-D-Glucoside | C3 D-Psicose | C4 D-Raffinose | C5 L-Rhamnose | C6 D-Sorbitol | C7 Sucrose | C8 D-Trehalose | C9 Turanose | C10 Xylitol | C11 Pyruvic Acid Methyl Ester | C12 Succinic Acid Mono-Methyl-Ester |
| D1 Acetic Acid | D2 Cis-Aconitic Acid | D3 Citric Acid | D4 Formic Acid | D5 D-Galactonic Acid Lactone | D6 D-Galacturonic Acid | D7 D-Gluconic Acid | D8 D-Glucosaminic Acid | D9 D-Glucuronic Acid | D10 α-Hydroxybutyric Acid | D11 β-Hydroxybutyric Acid | D12 γ-Hydroxybutyric Acid |
| E1 p-Hydroxy Phenylacetic Acid | E2 Itaconic Acid | E3 α-Keto Butyric Acid | E4 α-Keto Glutaric Acid | E5 α-Keto Valeric Acid | E6 D,L-Lactic Acid | E7 Malonic Acid | E8 Propionic Acid | E9 Quinic Acid | E10 D-Saccharic Acid | E11 Sebacic Acid | E12 Succinic Acid |
| F1 Bromosuccinic Acid | F2 Succinamic Acid | F3 Glucuronamide | F4 L-Alaninamide | F5 D-Alanine | F6 L-Alanine | F7 L-Alanyl-glycine | F8 L-Asparagine | F9 L-Aspartic Acid | F10 L-Glutamic Acid | F11 Glycyl-L-Aspartic Acid | F12 Glycyl-L-Glutamic Acid |
| G1 L-Histidine | G2 Hydroxy-L-Proline | G3 L-Leucine | G4 L-Ornithine | G5 L-Phenylalanine | G6 L-Proline | G7 L-Pyroglutamic Acid | G8 D-Serine | G9 L-Serine | G10 L-Threonine | G11 D,L-Carnitine | G12 γ-Amino Butyric Acid |
| H1 Urocanic Acid | H2 Inosine | H3 Uridine | H4 Thymidine | H5 Phenethyl-amine | H6 Putrescine | H7 2-Aminoethanol | H8 2,3-Butanediol | H9 Glycerol | H10 D,L-α-Glycerol Phosphate | H11 α-D-Glucose-1-Phosphate | H12 D-Glucose-6-Phosphate |

Figure 28 : Sources carbonées contenues dans chaque puits de biolog GN2.

Parmi ces dernières, sont retrouvés les polymères (A2 à A6), les carbohydrates (A7 à C10), les esters (C11 à C12), les acides carboxyliques (D1 à F2), les composés azotés (F3 à H1), les composés aromatiques (H2 à H4), les amines (H5, H6), les alcools (H7 à H9) et les composés phosphorés (H10 à H12). Le sel de tétrazolium est un indicateur qui devient coloré

(rose violet) lorsqu'il se réduit. Sa réduction met en évidence l'utilisation de la source carbonée car ce sel est réduit par les coenzymes (NADH, H^+) issus de la respiration des microorganismes en milieu aérobie.

Dans le cadre de notre étude, des biologs GN2 sont utilisés pour mettre en évidence le profil métabolique des communautés microbiennes présentes dans les eaux d'alimentation et de récupération du bioréacteur, ainsi que celui du biofilm. Les microplaques sont inoculées avec 150 μ L d'eau brute dans chaque puit, à l'aide d'une pipette multicanaux. L'ensemble est incubé à 22°C pendant 24h, 48h et 72h. Toutes les 24h, une lecture d'absorbance à 590 nm est réalisée grâce à un lecteur de microplaques. Dans un premier temps, pour interpréter les résultats, une moyenne des absorbances obtenues par famille de composés carbonés est effectuée pour chaque biologs après avoir soustrait l'absorbance du « blanc ». Par la suite, toutes les absorbances moyennes sont ajoutées, ainsi, nous avons établi un pourcentage pour chaque famille de ce qui a été consommé par les communautés de microorganismes.

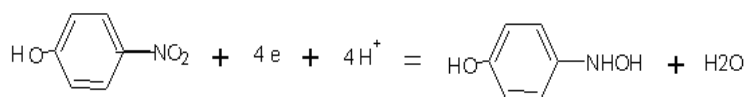
II.5.12/ Dosage des nitrates par chromatographie ionique

La CI (L'appareillage utilisé est une CI METROHM est une méthode d'analyse séparative qui a été mise en œuvre pour doser les nitrates. Ce procédé comprend une phase stationnaire (colonne échangeuse d'ions cationique METROSEP ASUPP 5-250 de taille 4,6 \times 250 mm) et une phase mobile (éluant composé d'un mélange de Na_2CO_3 , $10H_2O$ à $3,2 \cdot 10^{-3}M$ et $NaHCO_3$ à $10^{-3}M$). Le volume d'échantillon d'eau prélevé pour doser les nitrates est de 20 μ L. Le flux est de 0,70 mL/min à 20°C et 4,9 MPa.

II.5.13/ Microélectrode à paranitrophénol

La détection du paranitrophénol avant et après mise en contact avec un biofilm épiphytique en laboratoire à l'université d'Angers a été mise en œuvre via l'utilisation d'une microélectrode à fibre de carbone « maison ». Le principe du procédé analytique est basé sur la mesure d'un courant dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'analyte cible. L'intensité du pic (I_{pic}) est directement proportionnelle à la concentration du polluant recherché, au potentiel de -0,8 V/ECS.

Il s'agit d'un capteur ampérométrique, pour un dosage direct du paranitrophénol selon la réaction 2.



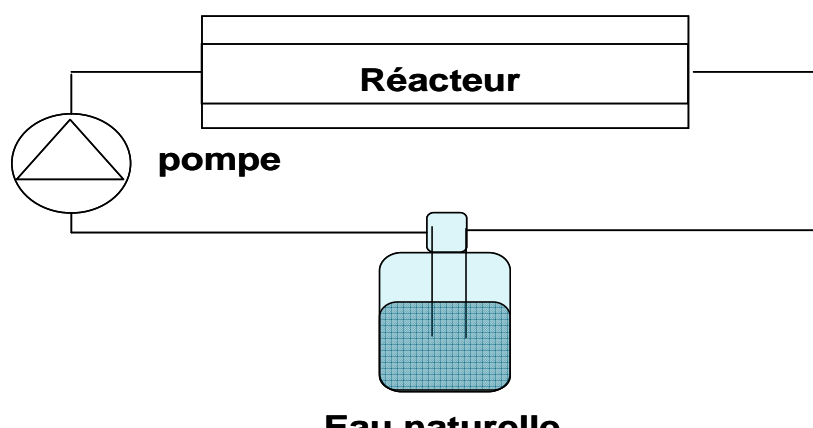
Réaction 2

La mesure est réalisée dans une cellule classique à 3 électrodes, avec une contre-électrode sous la forme d'un fil de platine, une électrode de référence au calomel saturée (ECS) et la microélectrode à fibre de carbone, comme rapporté récemment (Sbaï *et coll.* 2007, Tapsoba *et coll.* 2009). Les 3 électrodes sont plongées dans la solution à analyser qui est contenue dans une cellule de mesure d'une capacité de 10 ml. L'ensemble est relié à un potentiostat qui est chargé de récolter le courant. Un traitement du signal est effectué afin d'obtenir un courant plus propre (moins de courants parasites, moins de bruit). Le potentiostat est relié à un ordinateur qui permet le stockage des données acquises et leur traitement. A la fin sur l'écran de l'ordinateur *via* le logiciel d'acquisition, la concentration inconnue du polluant est affichée.

Nous ne pouvons donner plus de détails sur le matériel employé (potentiostat, type de traitement du signal, logiciel d'acquisition, type de microélectrode, etc.) car cet outil est actuellement en phase d'incubation dans le cadre d'une entreprise innovante au sein de l'incubateur d'Angers Technopôle.

II.5.12.2/ Réacteur à biofilm

La Figure 29 montre que le réacteur à biofilm schématisé et illustré ci-dessous, est monté en circuit fermé pour l'étude préliminaire sur le suivi de dégradation de deux types de polluants : le paranitrophénol et les nitrates. Le débit se situe à $3 \pm 0,2 \text{ L.h}^{-1}$ avec un temps de séjour dans le réacteur, de 104 secondes.





a/ Réacteurs sans biofilms

b/Réacteurs avec biofilms

Figure 29 : Schéma du bioréacteur en circuit fermé

Le réacteur de 70 cm³ est constitué d'une double enveloppe qui permet son isolation thermique. Une pompe est installée dans le but de maintenir la circulation d'eau dans le réacteur. Dans un premier temps, l'eau de surface eutrophisée est prélevée pour élaborer le biofilm. Afin de limiter l'évolution des paramètres physico-chimiques, une partie de cette eau est stockée à 4 °C. Tous les 3 jours, un renouvellement d'eau (eau stockée) est nécessaire pour que le biofilm puisse continuer à se développer. Une eau naturelle prise à proximité de la faculté des sciences à Angers, l'eau de l'étang St Nicolas, a été utilisée pour élaborer pendant 15 jours le biofilm sur anneaux de verres. Par la suite, l'eau naturelle a été microfiltrée (0,14 µm) et dopée en PNP et en nitrates. Pour le PNP la concentration a été fixée à 50 mg/L. Un réacteur témoin sans biofilm a permis de vérifier que le PNP ne disparaissait pas par ailleurs (par exemple par photodégradation). Pour les nitrates, la concentration a été fixée à 170 mg/L. et à 130 mg/L dans un témoin sans biofilm initial.

CHAPITRE III : DIAGNOSTIC SUR LE LAC DE RIBOU

Les travaux ont commencé par un diagnostic sur le lac de Ribou. Ce diagnostic est réalisé à partir des données physico-chimiques et a pour but de mettre en évidence la station la plus anthropisée afin d'axer nos travaux préliminaires de restauration au niveau de cette zone.

III.1/ LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES SUIVIS AU COURS DES MOIS

Sur les 3 stations étudiées (TR, AV et ZB), 16 paramètres physico-chimiques sont suivis mensuellement depuis plusieurs années. Le tableau 13 indique ces différents paramètres suivis sur les 3 stations durant la campagne du 17 juillet 2006. Les cases colorées correspondent aux valeurs les plus élevées sur les 3 stations.

Tableau 13 : Suivis des paramètres physico-chimiques sur le lac de Ribou

| Date | 17.07.06 | 17.07.07 | 17.07.08 | Ecart Type (±) |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------------|
| Stations | TR | AV | ZB | |
| Température (°C) | 18,3 | 20,6 | 27,4 | 0,1 |
| Oxygène (mg/L) | 2 | 9 | 14,3 | 0,5 |
| %saturation O2 | 21,4 | 100 | 181 | 0,5 |
| Conductivité (µS/cm) | 468 | 340 | 338 | 2 |
| pH | 6,9 | 7,3 | 9 | 0,01 |
| Chlorophylle a (µg/L) | 38,9 | 7,8 | 40,6 | 0,05 |
| KMnO4 (mg/L) | 15,7 | 5,5 | 8,1 | 0,2 |
| Nitrates (mg/L) | 1 | 18 | 6 | 0,5 |
| Ammonium (mg/L) | 0,292 | 0,134 | 0,128 | 0,001 |
| Azote Kjeldahl (mg/L) | 1,8 | 1,1 | 3 | 0,05 |
| Phosphate (mg/L) | 1,37 | < 0,1 | < 0,1 | 0,05 |
| phosphore (mg/L) | 0,895 | 0,127 | 0,259 | 0,05 |
| COT (mg/L) | 18,1 | 9,3 | 14,6 | 0,2 |
| COD (mg/L) | 16,5 | 8,7 | 10,4 | 0,2 |
| Fer (mg/L) | 3,59 | 0,12 | 0,14 | 0,05 |
| Mn (mg/L) | 2,14 | 0,32 | 0,11 | 0,05 |
| Heures de prélèvement | 12h00 | 12h40 | 10h30 | |

Le tableau 13 montre que la station TR apparaît comme la plus eutrophisée. En effet, les eaux de cette station sont plus riches en COT, COD, oxydabilité au KMnO₄, phosphore et phosphates avec des valeurs respectives de 18,1 mg/L, 16,5 mg/L, 15,7 mg/L, 0,895 mg/L, 1,37 mg/L. On notera également des fortes concentrations en fer (3,59 mg/L) et en manganèse (2,14 mg/L) liées probablement à du relargage des sédiments d'autant plus que les concentrations en oxygène dissous sont très faibles (2 mg/L). Cette station apparaît plus minéralisée par rapport aux 2 autres avec une conductivité de 468 µS/cm. Les concentrations

en NH_4^+ sont aussi plus élevées par rapport aux autres stations du lac (0,292 mg/L). Les eaux prélevées au niveau de la station AV sont les plus riches en nitrates (18 mg/L). La station ZB constitue une zone où l'activité algale est plus marquée durant cette période de l'année. Les taux de chlorophylle *a* atteignent les 40 $\mu\text{g/L}$. L'azote Kjeldahl est aussi plus élevé au sein de cette station ce qui est certainement lié à une production algale d'autant plus que le pH est assez élevé (pH = 9). La température (27,4 °C) et une concentration en oxygène dissous élevées (14,3 mg/L), associées à cette valeur de pH et de chlorophylle *a* soulignent une activité algale.

Les Figures 30 et 31 montrent les suivis des concentrations en P et en MO oxydable entre juin 2005 et décembre 2006. Le trait rouge représente les objectifs à atteindre qui sont de 0,03 mg/L pour le P et 10 mg/L pour la MO pour 2008 et 8 mg/L pour 2010. Les concentrations en P sont très élevées.

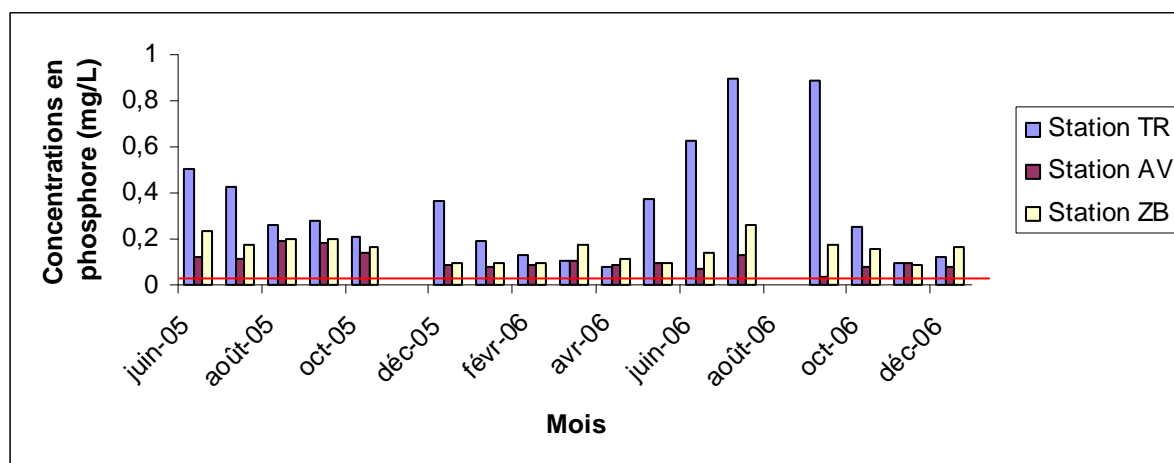


Figure 30 : Suivis des concentrations en phosphore au niveau des 3 stations (TR, AV, ZB) (précision $\pm 0,05$ mg/L)

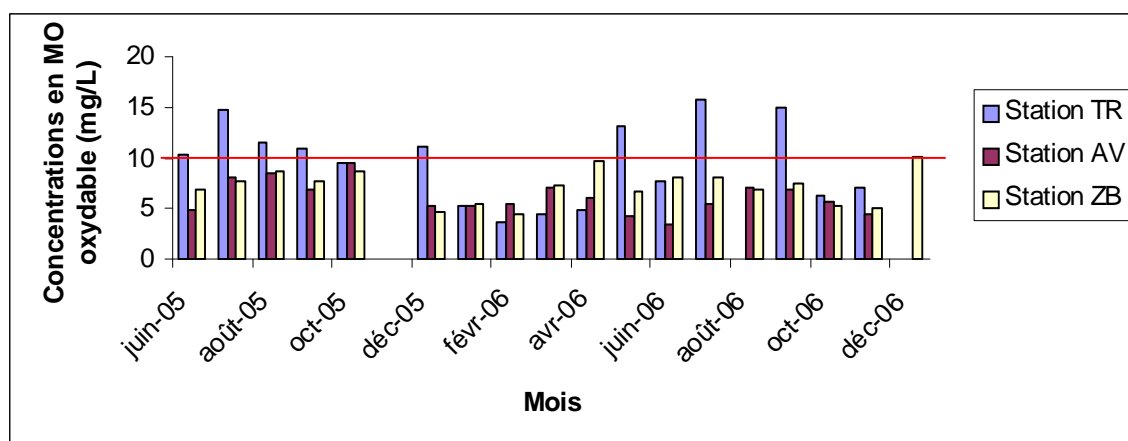


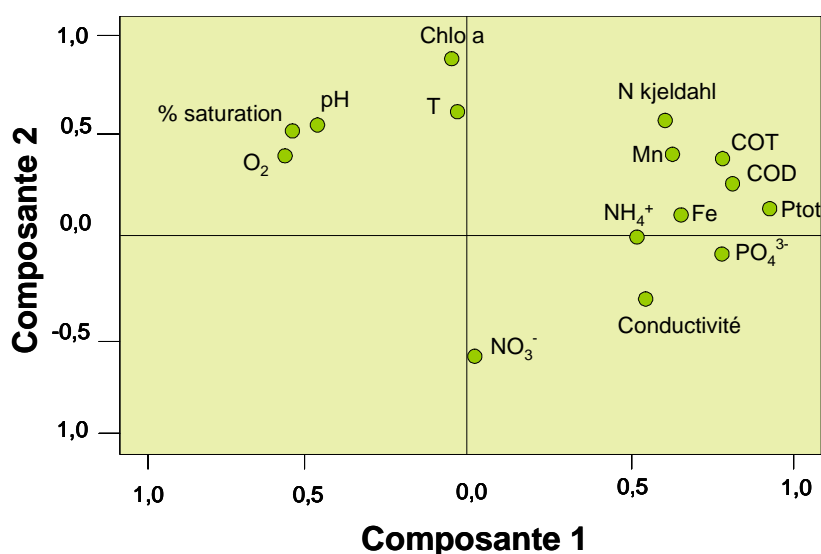
Figure 31 : Suivis des concentrations en MO oxydable au niveau des 3 stations (TR, AV, ZB) (précision $\pm 0,2$ mg/L)

Cette analyse permet de discriminer ces stations lors d'une campagne de prélèvement mais il est difficile de discriminer les stations entre elles à partir d'une seule campagne. Pour bien diagnostiquer la station la plus eutrophisée, il est nécessaire de travailler à partir d'une banque de données plus conséquente et comprenant tous ces paramètres physico-chimiques afin de réaliser une étude statistique complète par analyse en composante principale. Cette approche a pour objectif de discriminer la station la plus anthropisée ce qui orientera le choix de la zone prioritaire à étudier pour un aménagement futur.

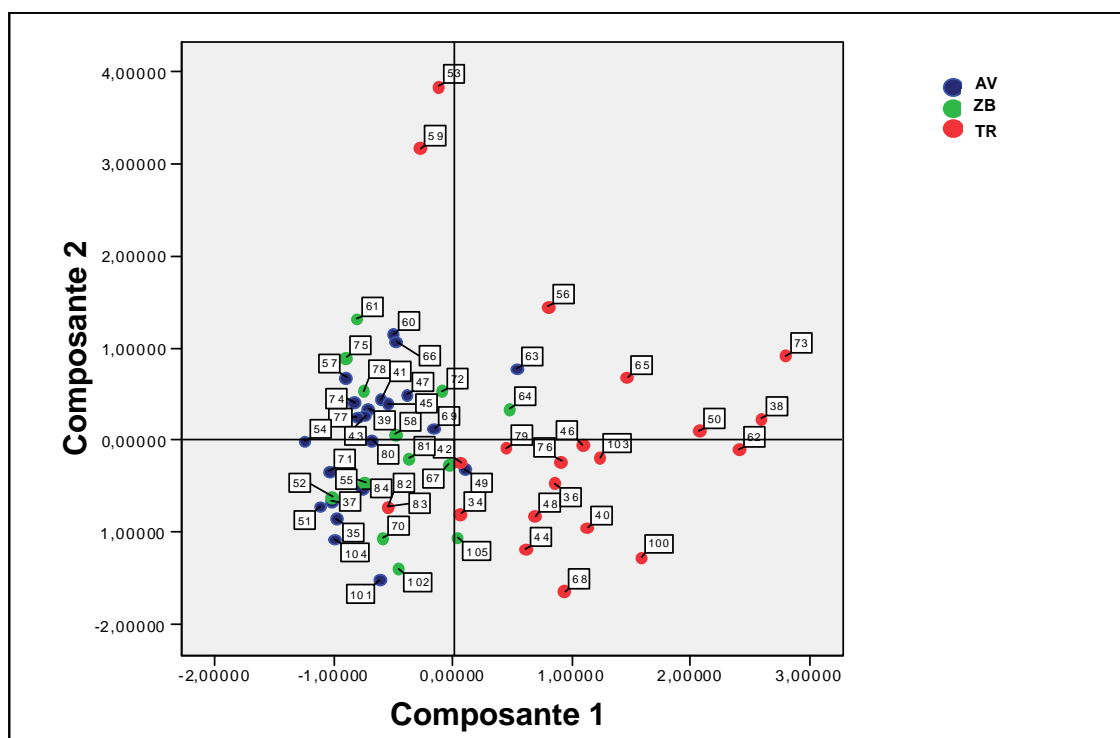
III.2/ L'ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE : UN OUTIL D'AIDE AU DIAGNOSTIC

Cette approche statistique montre qu'il est possible de mettre en évidence des corrélations (positives ou négatives) entre certains paramètres physico-chimiques analysés dans l'eau (par ex. O₂ dissous, pH, Cond., T) et de rassembler un ensemble de données conséquentes pour les faire apparaître dans un diagramme à 2 composantes X et Y. Il est alors possible de montrer les principaux processus qui gouvernent au sein d'une station donnée.

La Figure 32a correspond à un diagramme de dispersion des variables à deux composantes (1 et 2) où tous les paramètres physico-chimiques suivis aux trois points de prélèvements TR, AV, et ZB et sont projetés sur un plan en deux dimensions. La Figure 32b représente les diagrammes de dispersion des individus projetés dans le plan à deux composantes.



a/



b/

Figure 32 : Composantes principales 1 et 2 de l'ensemble des données physico-chimiques du lac de Ribou de janv. 2000 à juin 2006

Les numéros sur la Figure 32b correspondent au nombre de prélèvement réalisé au sein des différentes stations (annexe 1). Les stations marquées par les P_{tot} , PO_4^{3-} et COD forts sont les plus à droites et représentées en rouge (station TR, Figure 32). Les variables les plus marquées par la Chlorophylle *a* sont les numéros 53 et 59. Lorsque l'on descend le long de la composante 2, le niveau trophique diminue (ex : les variables 101 et 102 sont moins marquées par la chlorophylle *a*). Par ailleurs, la discrimination des stations est bien visible pour les paramètres P et COD. La station AV (Figure 30 et 31, Figure 32) est la moins marquée par ces éléments. La station ZB est intermédiaire. En effet, la station TR est plus dispersée que les stations ZB et AV. Il est possible d'attribuer cette observation d'une part à un effet de dilution pour les stations AV et ZB ou d'autre part à un apport de pollution par le Trézon plus important au niveau de la station TR. Ainsi les stations AV et ZB sont plutôt dispersées selon la composante 2 (niveau trophiques) alors que la station TR est plus dispersée selon la composante 1 (P + COD). Cela signifie que cette station est plus marquée par le P et COD.

Les résultats d'ACP montrent bien que la station TR est plus marquée par le P et le COD par rapport au 2 autres stations étudiées. Cela est lié aux apports anthropiques au sein du

Bassin Versant. La rivière du Trézon se jetant directement dans le lac de Ribou, la station TR est devenue prioritaire dans le cadre d'un futur aménagement. Pour cela, il est très important de bien connaître le site d'étude d'un point de vue floristique avant d'envisager les procédures d'aménagement de ce milieu. Par conséquent, l'étude a débuté par des inventaires floristiques associés à des taux de recouvrement de la végétation. Ces travaux préliminaires ont pour objectif d'effectuer un état des lieux et d'inventorier des espèces végétales potentiellement intéressantes pour épurer ce milieu en limitant les apports dans le lac de Ribou.

III.3/ LES INVENTAIRES FLORISTIQUES

III.3.1/ Etat des lieux sur la zone de confluence Trézon-Ribou (zone inondable)

Deux inventaires floristiques sont réalisés dans la zone d'étude au cours de l'année 2006 (mai et octobre). En mai 2006, les inventaires réalisés ont permis d'établir un état des lieux de la végétation au sein du site d'étude. En octobre 2006, les inventaires ont permis de suivre les espèces qui persistaient au cours du temps. Ce paramètre permet de sélectionner des espèces ayant un bon potentiel épuratoire, qui persistent sur l'année.

En mai 2006, 21 végétaux sont répertoriés. Parmi ceux qui sont majoritaires sur le site, *Rorippa amphibia* est présente surtout en zones émergées (Figure 33, à droite) et *Salix sp.* est situé en zone immergée (Figure 33, à gauche). Les autres espèces (*Juncus effusus*, *Phalaris arundinacea*, *Lycopus europaeus*...) sont plutôt présentes sur les rives du site d'étude.

La Figure 33 représente la zone d'étude avec les parties immergées en bleu foncé et émergées en bleu clair (mai 2006).

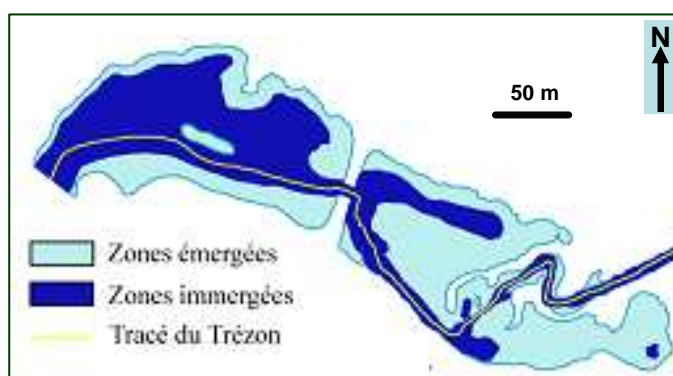



Figure 33 : Zone de confluence entre le Trézon et le lac de Ribou (Mai 2006)

En octobre 2006, la zone d'étude est totalement immergée. Sur les 12 espèces végétales répertoriées, *Juncus effusus*, *Lemna minor*, *Phalaris arundinacea*, *Salix sp.* sont majoritaires. Il faut noter la disparition de *R. amphibia* ainsi que la présence de *Lemna minor*

qui fait partie des espèces majoritaires alors qu'elle commençait à peine à se multiplier au mois de mai. Les saules et les joncs sont toujours très présents durant ces deux périodes de l'année. Le Tableau 14 montre les espèces retrouvées au cours de l'année 2006 sur le site. Ces espèces sont répertoriées dans l'annexe 2 (herbier numérique).

Tableau 14 : Espèces végétales répertoriées au cours de l'année 2006 (mai et octobre)

| | Mai 2006 | Octobre 2006 |
|---|---|---|
| Espèces majoritaires | <i>Rorippa amphibia</i> (a) <i>Salix</i> sp. <i>Juncus effusus</i> | <i>Juncus effusus</i> <i>Lemna minor</i> <i>Phalaris arundinacea</i> <i>Salix</i> sp. |
| Autres  | <i>Lemna minor</i> <i>Phalaris arundinacea</i> (b) <i>Persicaria maculosa</i> <i>Mentha aquatica</i> <i>Carex</i> sp <i>Iris pseudacorus</i> <i>Aulus glutinosus</i> <i>Rumex crispus</i> <i>Urtica dioica</i> <i>Lycopus europaeus</i> <i>Ranunculus peltatus</i> <i>Oenanthe crocata</i> <i>Callitriche</i> .sp <i>Alisma plantago-aquatica</i> (c) <i>Lythrum salicaria</i> <i>Solanum dulcamara</i> <i>Cirsium</i> sp. <i>Myosotis scorpioides</i> | <i>Persicaria maculosa</i> <i>Mentha aquatica</i> <i>Carex</i> sp <i>Iris pseudacorus</i> <i>Aulus glutinosus</i> <i>Rumex crispus</i> <i>Urtica dioica</i> <i>Lycopus europaeus</i> <i>Pousses</i> |

En mai 2006, afin de compléter les inventaires, la détermination du taux de recouvrement pour chaque espèce a été effectuée sur le site par la méthode de Braun-Blanquet.

III.3.2/ Détermination de l'aire minimale requise

L'estimation de l'aire minimale requise a été déterminée en bordure de zone immergée du site d'étude. La zone de base est donc émergée. Le Tableau 15 montre le résultat obtenu pour la détermination de l'aire minimale de quadrat à utiliser pour réaliser les inventaires floristiques.

Tableau 15 : Résultat obtenu suite à la méthode de Braun-Blanquet permettant de connaître la surface du quadrat à utiliser pour la détermination de l'abondance des espèces.

| Aire du quadrat (m ²) | Nouvelles espèces | Nombre total d'espèces |
|-----------------------------------|--|------------------------|
| 1 | <i>Lycopus europaeus</i> <i>Phalaris arundinacea</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Espèce indéterminée1 (pousse)</i> | 4 |
| 2 | <i>Juncus effusus</i> <i>Lemna minor</i> <i>Lythrum saliciria</i> | 7 |
| 4 | <i>Iris pseudacorus</i> <i>Mentha aquatica</i> <i>Oenanthe crocata</i> <i>Ranunculus peltatus</i> | 11 |
| 8 | <i>Carex</i> sp. | 12 |
| 16 | <i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Salix</i> sp. | 14 |
| 32 | <i>Callitriche</i> sp. | 15 |
| 64 | - | 15 |

D'après le Tableau 15 qui indique les espèces recensées, la nouvelle espèce répertoriée sur le quadrat 32 m² est une callitriche. Par conséquent, cette dernière étant une espèce aquatique, n'est pas prise en considération pour la détermination de l'aire minimale car elle ne fait pas partie du même milieu homogène. La Figure 34 représente le nombre d'espèces végétales en fonction de la dimension du quadrat.

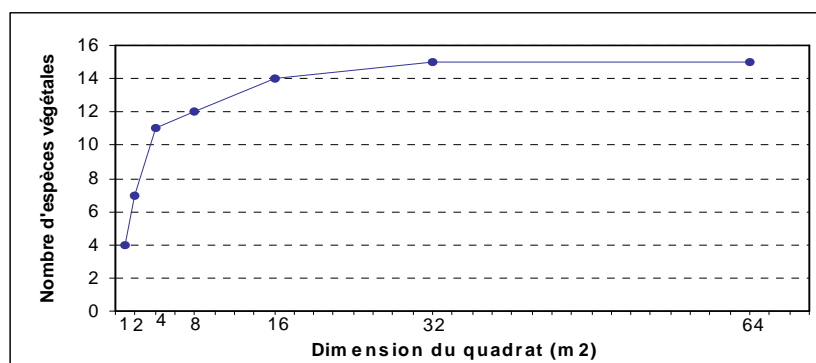


Figure 34 : Graphique montrant le nombre d'espèces végétales en fonction de la dimension du quadrat.

Les résultats montrent qu'un plateau caractéristique se forme dès 32m² indiquant l'absence de nouvelles espèces répertoriées. Le quadrat minimal choisi est alors une surface de 5m x 5m (25m²), qui est un intermédiaire entre 16m² et 32m² afin de répertorier des

espèces présentes ponctuellement dans le milieu. Cette surface de quadrat a été appliquée pour la réalisation des inventaires en zone immergée. Les zones étant hétérogènes, de nombreuses parcelles ont dû être délimitées. La Figure 35 montre les différentes zones délimitées du site d'étude divisé en 115 parcelles.

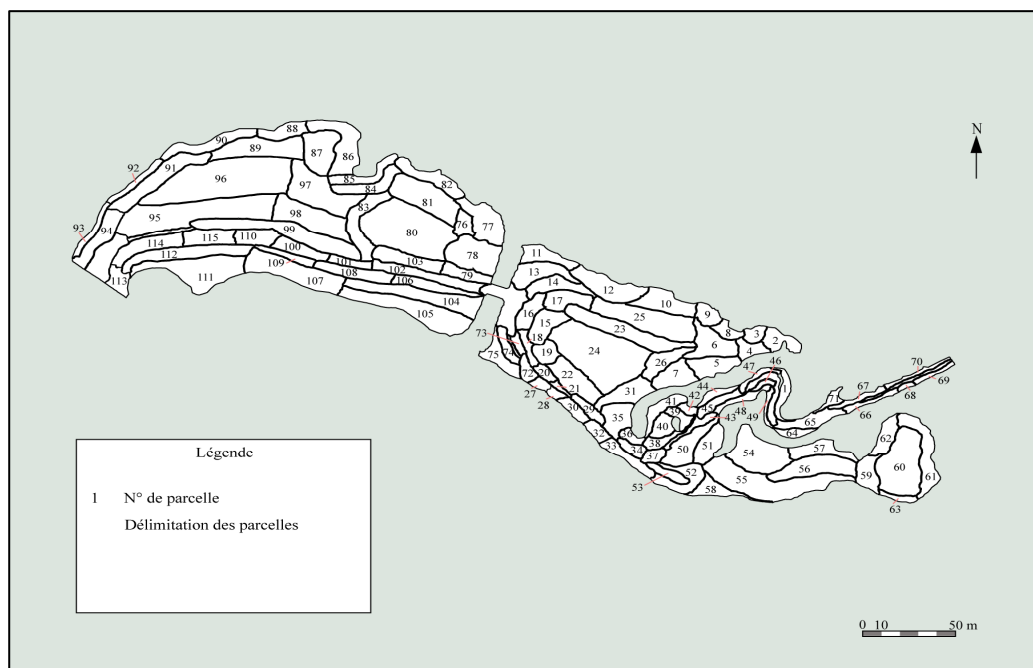


Figure 35 : Délimitation des parcelles sur lesquelles ont été effectués les relevés pour déterminer le recouvrement floristique.

Recouvrement de la végétation du site

Les résultats des recouvrements sur chaque parcelle numérotée sont présentés en Annexe 3. Seul le recouvrement de quelques espèces a été cartographié. Sur cette annexe sont représentées toutes les abondances-dominances pour chaque parcelle et chaque espèce étudiées. Elles sont notées +, I, II, III, IV ce qui correspond au taux de recouvrement respectif, et sont associées à une couleur pour réaliser une cartographie. Ces correspondances sont les suivantes : présence (jaune pâle), moins de 5 % (jaune), de 5 à 25 % (orange clair), de 25 à 50 % (orange foncé), de 50 à 75 % (rouge), et plus de 75 % (marron).

Pour comprendre et émettre les premières hypothèses sur la répartition de la végétation, une carte des zones inondées et émergées est jointe à la Figure 36.

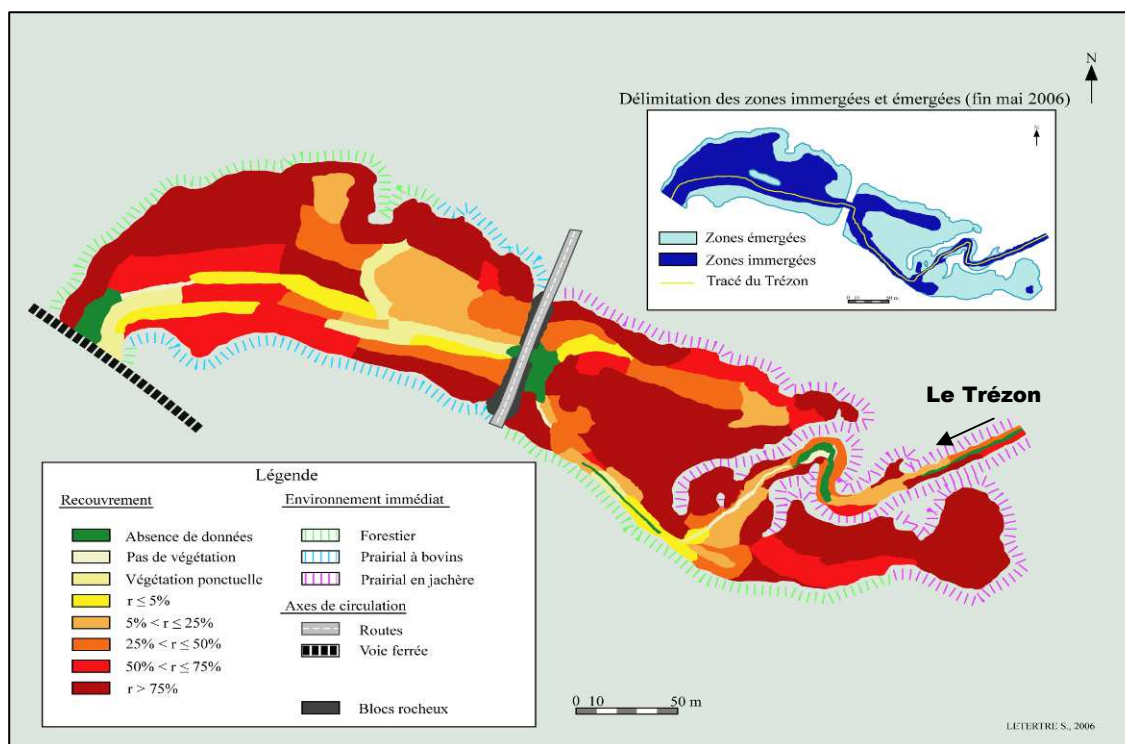


Figure 36 : Recouvrement végétal de la zone inondable à la confluence Trézon-Ribou (fin mai 2006)

La Figure 36 met en évidence le taux de recouvrement global du site par la végétation (données brutes, Annexe 3). Durant la période d'échantillonnage (fin mai), ce dernier est beaucoup plus faible dans les zones submergées. En effet, à l'*Est* de la route (coté Trézon), la végétation couvre souvent plus de 75% de la surface en zone émergée. Elle est fortement représentée par *Rorippa amphibia* et de *Lemna minor*, *Ranunculus peltatus*. En revanche, à l'*Ouest* de la route, les parcelles qui représentent plus de 75% de recouvrement végétal sont les zones immergées. Elles sont en majorité dominées par *Salix* sp. et *Lycopus europaeus*. Les autres parcelles aquatiques n'ont en général qu'un recouvrement de 1 à 25 % pendant cette période de l'année.

Après avoir effectué une cartographie du recouvrement total, une cartographie du taux de recouvrement des espèces fortement majoritaires comme *R. amphibia* (Figure 37), et *Salix* sp. (Figure 38) a été réalisée.

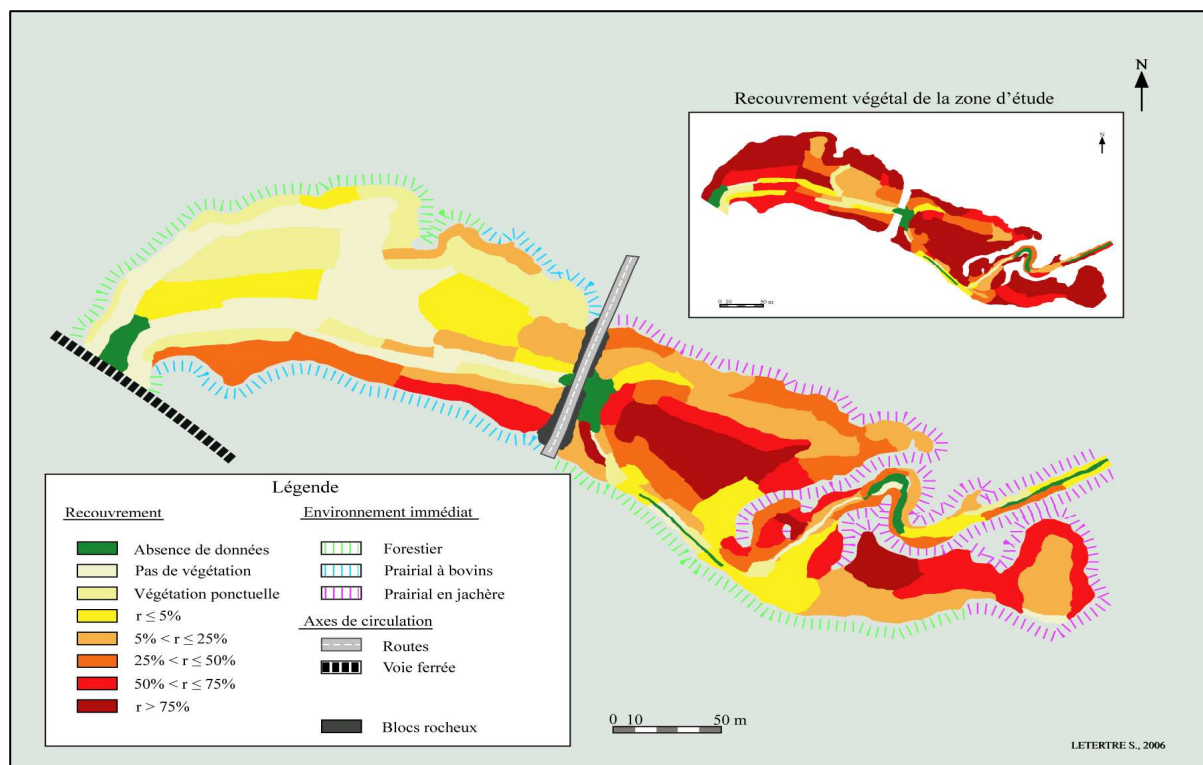


Figure 37 : Recouvrement de *Rorippa amphibia* à la confluence Trézon-Ribou (fin mai 2006).

Il apparaît que cette plante a une densité beaucoup plus importante dans la partie *Est*, située dans une zone majoritairement émergée. De plus, cette espèce est moins présente lorsque les rives de la zone inondée sont bordées par une strate arborescente (Figure 38).

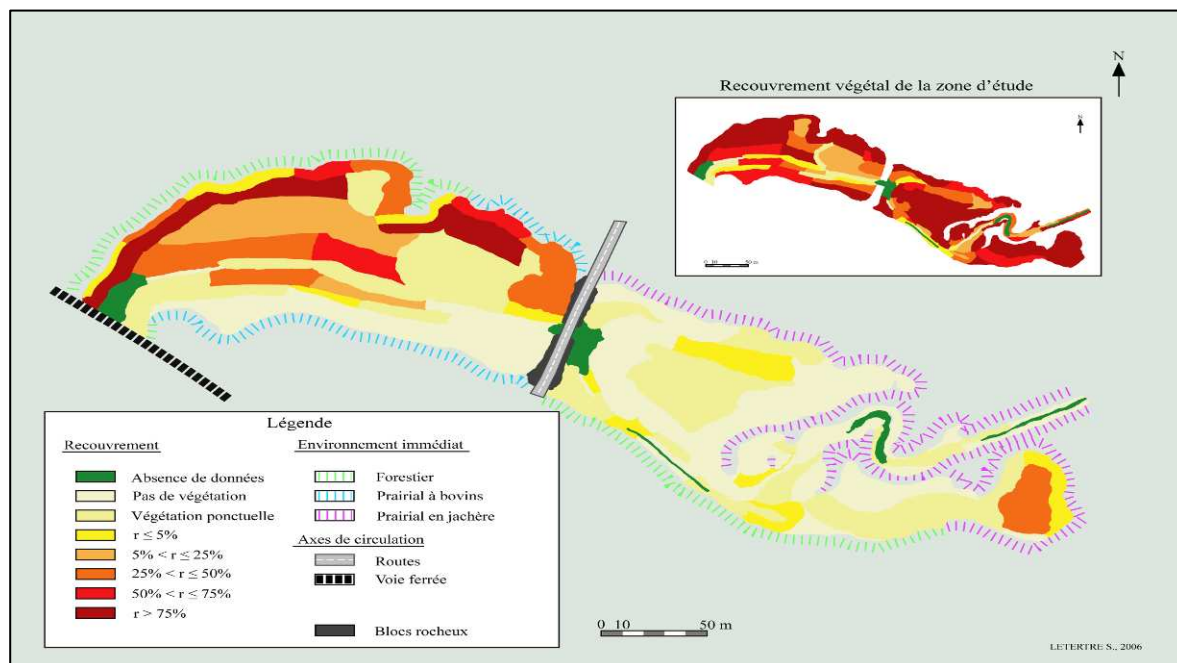


Figure 38 : Recouvrement de *Salix* sp. à la confluence Trézon-Ribou (fin mai 2006)

La Figure 38 indique que *Salix sp.* s'est développé à l'opposé de *Rorippa amphibia*, dans la moitié *Ouest* du site. Il est présent de manière abondante dans les parcelles ayant une colonne d'eau d'environ 30-40 cm. En revanche, il n'est présent, fin mai 2006, que sporadiquement dans les zones dépourvues de bordure forestière et dans les zones émergées.

La comparaison des deux cartes permet de constater que ces deux végétaux ne cohabitent que très rarement ensemble. L'un étant retrouvé préférentiellement dans les zones émergées (*R amphibia*) et l'autre dans les zones encore inondées souvent bordées d'une strate arborescente (*Salix sp.*) (Figure 37 et 38).

Les inventaires floristiques ont permis d'effectuer un état des lieux du site d'étude. En effet, la présence de *Rorippa amphibia* et d'*Alisma plantago-aquatica* montre que le milieu a une tendance à l'eutrophisation générale (Bournérias, 1979). Ces résultats sont confirmés par la présence de *Phalaris arundinacea* qui est témoin d'un milieu déjà eutrophisé. Cette dernière représente l'espèce principale d'un groupement appelé *Phalaridaie*. Ce groupe d'espèces est résistant à un bouleversement anthropique (Bournérias, 1979). Les espèces répertoriées et associées à *Phalaris arundinacea* dans le cadre de notre étude qui caractérisent la *Phalaridaie* sont *Lythrum salicaria*, *Lycopus europaeus*, *Rorippa amphibia*, *Alisma plantago-aquatica* et *Mentha aquatica*. Il est à noter que de nombreuses espèces, incluses dans ce groupe, n'ont pas été repertoriées comme *Epilobium hirsutum* et *Eupatorium cannabinum*.

La présence d'*Urtica dioica* est un indicateur qui marque la rudéralisation (dégradation du milieu par apports anthropiques (d'azote notamment)) ou une dégradation de la *Phalaridaie*. En effet, les analyses (Tableau 15) montrent qu'il y a des apports importants d'azote (nitrates) par le biais de la rivière du Trézon.

La présence d'une *Saulaie* (*Salix sp.*) peut marquer un atterrissement progressif du milieu (Bournérias, 1979) lorsque cette dernière devient envahissante. D'où l'intérêt de suivre son évolution dans les années à venir. L'état du milieu d'un point de vue floristique s'accorde avec les analyses d'eau correspondantes. Le tableau 16 montre les analyses physico-chimiques effectuées sur l'eau issue de la zone d'étude. 16 paramètres ont été suivis au cours du temps dont les nitrates, la MO oxydable et le phosphore (Aquascop, 2006).

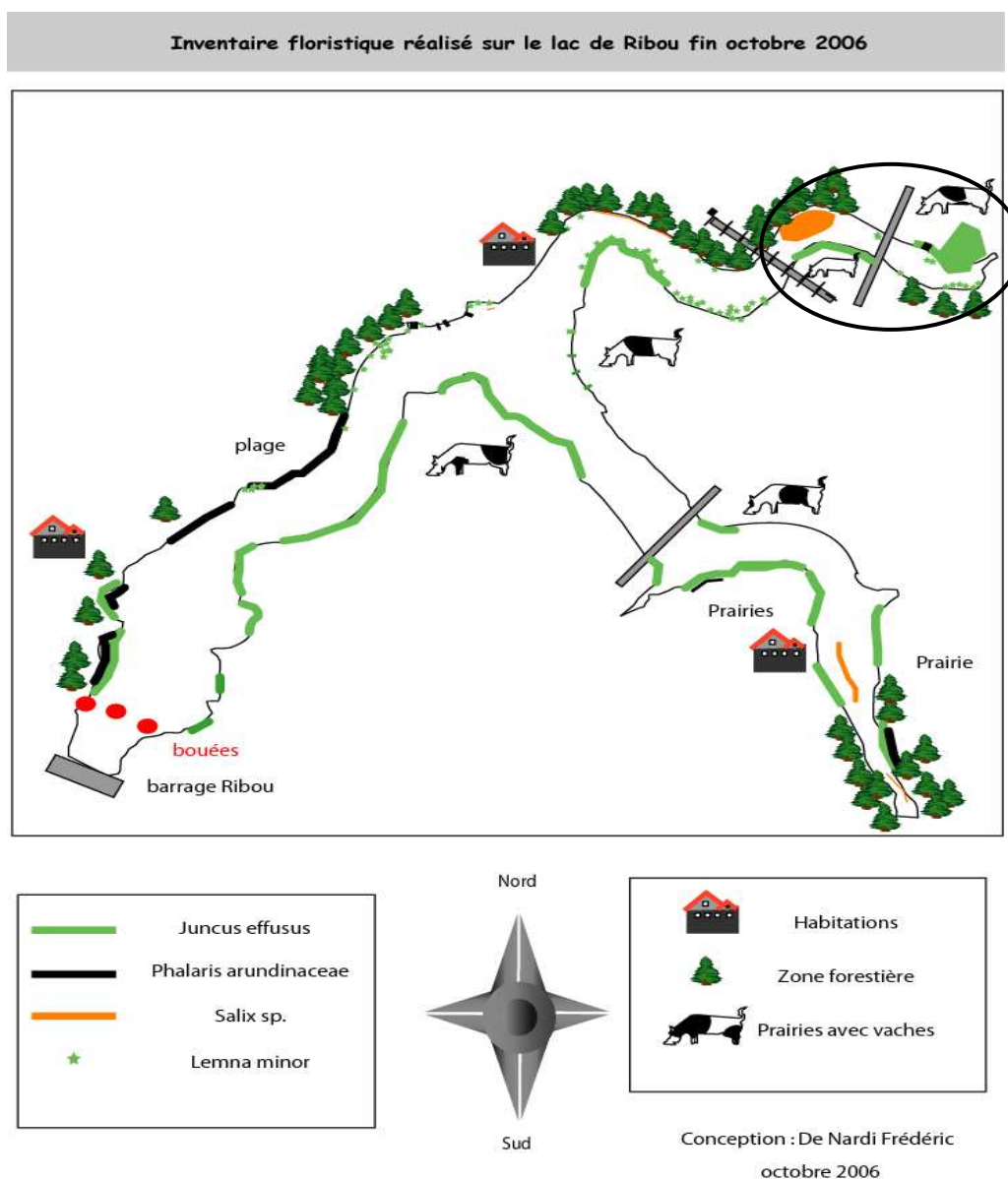
Tableau 16 : Analyses physico-chimiques de l'eau issue de la station TR

| Date | mars-06 | avr-07 | mai-07 | juin-06 | Ecart Type (±) |
|-----------------------|---------|--------|--------|---------|----------------|
| Température (°C) | 5,4 | 10,5 | 14,2 | 19,2 | 0,1 |
| Oxygène (mg/L) | 12,4 | 14,5 | 3,62 | 8,3 | 0,5 |
| %saturation O2 | 99 | 130 | 36,2 | 90 | 0,5 |
| Conductivité (µS/cm) | 389 | 389 | 385 | 389 | 2 |
| pH | 7,5 | 8,1 | 6,8 | 7,6 | 0,01 |
| Chlorophylle a (µg/L) | nd | nd | 6 | 1,4 | 0,05 |
| KMnO4 (mg/L) | 4,4 | 4,9 | 13,2 | 7,6 | 0,2 |
| Nitrates (mg/L) | 65 | 52 | 10 | 6 | 0,5 |
| Ammonium (mg/L) | 0,156 | <0,020 | 0,352 | 0,096 | 0,001 |
| Azote Kjeldahl (mg/L) | <1 | 1 | 1,8 | 1,6 | 0,05 |
| Phosphate (mg/L) | <0,1 | <0,1 | 0,41 | 1,29 | 0,05 |
| phosphore (mg/L) | 0,102 | 0,081 | 0,374 | 0,622 | 0,05 |
| COT (mg/L) | nd | nd | 14 | 14 | 0,2 |
| COD (mg/L) | nd | nd | 13 | 13 | 0,2 |
| Fer (mg/L) | nd | nd | 0,53 | 0,35 | 0,05 |
| Mn (mg/L) | nd | nd | 0,16 | 0,17 | 0,05 |
| Débit (L.s-1) | 355 | 155 | 22 | | |
| Heures de prélèvement | 12h00 | 12h45 | 10h15 | 12h00 | |

Le Tableau 16 indique que les eaux du site de la station TR sont riches en nitrates (65 mg/L en mars ; norme eau brute pour la production d'eau potable : 50 mg/L) majoritairement apportés durant le mois de mars avec un débit de 355 L.s-1, et sont compatibles avec la présence de l'espèce *Urtica dioica* qui est nitrophile. Les concentrations en P sont également très élevées (varient de 0,08 mg/L à 0,622 mg/L, norme : inférieur à 0,03 mg/L). Le COT dépasse largement les 10 mg/L (14 mg/L) pendant la période des inventaires. Ces résultats révèlent que le milieu est déjà très eutrophisé et sont bien cohérents avec les espèces végétales se développant *in situ*.

III.3.3/ Etat des lieux sur le lac de Ribou

Un inventaire floristique a ensuite été effectué sur l'ensemble du lac de Ribou afin d'obtenir un état des lieux général de la ressource. La Figure 39 met en évidence la répartition des espèces végétales majoritaires en octobre 2006 présentes sur les rives du lac de Ribou. Les espèces majoritaires observées au niveau de la zone TR sont les mêmes qui sont retrouvées sur l'ensemble du lac. En effet, les Joncs (*Juncus effusus*, en vert), les Faux roseaux (*Phalaris arundinacea*, en noir), les Saules (*Salix sp.*, en orange) et les lentilles d'eau (*Lemna minor*, étoile verte) sont les principales espèces présentes sur le lac de Ribou en octobre 2006.



**Figure 39: Inventaire floristique réalisé sur l'ensemble du lac de Ribou (octobre 2006)
(La Station TR est entourée de noir)**

La Figure 39 montre la présence d'une *Phalaridaie* allant de la plage vers les bouées (3 ronds rouges) traduisant le caractère eutrophe de cette zone. En effet, la moyenne annuelle (2006) de la concentration en P dans cette zone se situe entre 0,08 et 1 mg/L confirmant le caractère eutrophe de la retenue. La concentration moyenne en MO oxydable se situe entre 10 et 50 mg/L classant également l'eau de mauvaise qualité. La « *Phalaridaie* » étant résistante à un bouleversement anthropique, sa présence est bien caractéristique d'une eau eutrophe.

Les végétaux, comme il a été montré lors des études antérieures (Bournérias, 1972 ; Haury *et coll.*, 2006), sont des indicateurs de qualité d'eau et pourraient être utilisés également

pour épurer les eaux (Picard *et coll*, 2005) en présence de microorganismes fixés (biofilms) sur ces derniers (Bourgues et Hart, 2007). **Nous avons supposé que les capacités épuratoires des biofilms dépendent de leurs compositions. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés dans un premier temps, à la caractérisation de ces biofilms naturels en étudiant leur composition biologique et chimique.**

III.4/ ETUDE DES BIOFILMS EPIPHYTIQUES NATURELS

III.4.1/ Mise en évidence de biofilms sur les hélophytes répertoriés (Station TR)

Le tableau 17 regroupe les résultats obtenus sur l'ensemble des échantillons observés au FESEM et dont le dénombrement a été effectué à l'aide d'un microscope photonique.

Tableau 17 : Tableau récapitulatif de la présence – absence de biofilms sur les échantillons prélevés respectivement en mai et octobre 2006 (Précision $\pm 5\%$).

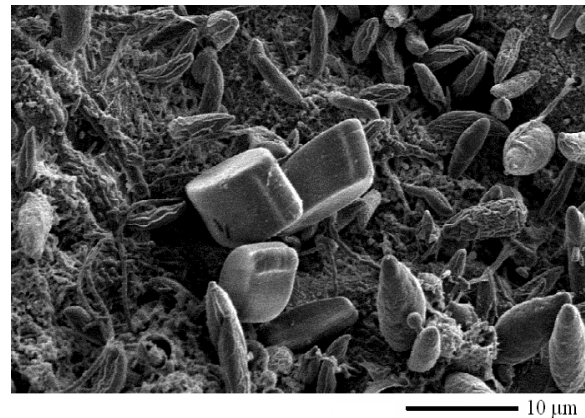
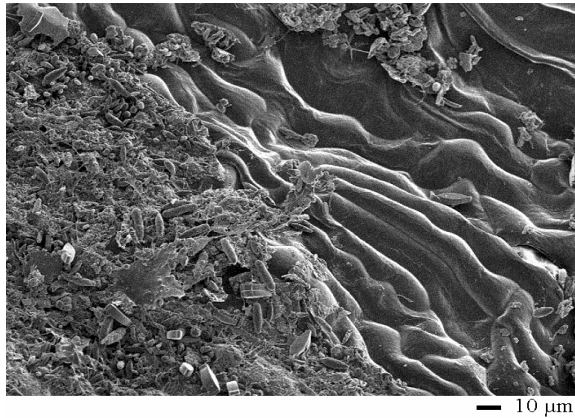
| | Genres/Espèces | Tissus étudiés | Présence de biofilm | Diatomées | Algues | Cyanobactéries | Inconnus |
|---------|-----------------------------|------------------|-----------------------|-----------|--------|----------------|----------|
| Mai | <i>Rorippa amphibia</i> | tige | oui | 13% | 77% | 10% | |
| | | feuille | oui | nd | nd | nd | nd |
| | <i>Lycopus europæus</i> | tige | oui | nd | nd | nd | nd |
| | <i>Lemna minor</i> | fronde flottante | oui | nd | nd | nd | nd |
| | | racine | début de colonisation | nd | nd | nd | nd |
| | <i>Callitriche</i> sp. | feuille | oui | nd | nd | nd | nd |
| | <i>Juncus effusus</i> | tige | oui | 53% | 47% | 0% | 0% |
| | <i>Ranunculus peltatus</i> | tige | oui | nd | nd | nd | nd |
| | <i>Salix</i> sp. | tige | oui | 8% | 87% | 3% | 2% |
| | <i>Alisma plantoquatica</i> | tige | oui | 5% | 94% | 1% | 0% |
| | <i>Oenanthe crocata</i> | tige | oui | 1% | 98% | 1% | 0% |
| | <i>Juncus effusus</i> | tige | oui | 53% | 37% | 0% | 0% |
| | <i>Mentha aquatica</i> | tige | oui | 52% | 42% | 5% | 1% |
| Octobre | <i>Phalaris arundinacea</i> | tige | oui | 57% | 32% | 9% | 2% |
| | <i>Lemna minor</i> | fronde flottante | oui | 53% | 0% | 10% | 37% |
| | <i>Salix</i> sp. | tige | oui | nd | nd | nd | nd |

Le Tableau 17 montre que sur tous les végétaux étudiés, un biofilm a été observé à l'exception des racines de *Lemna minor*. Nous supposons que, comme la croissance de cette dernière étant exponentielle, le temps d'immersion n'est pas suffisamment important pour observer un biofilm.

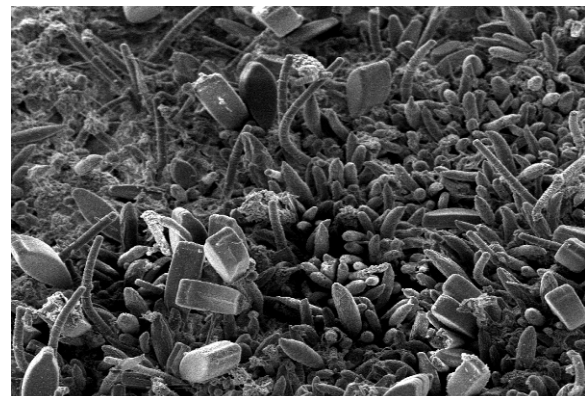
Globalement, les algues prédominent au sein des biofilms épiphytiques en Mai 2006, même si sur les tiges de *Juncus effusus*, les diatomées et les algues sont présentes dans les mêmes proportions. En revanche, les diatomées deviennent majoritaires en Octobre 2006 (Tableau 16).

La Figure 40 illustre les biofilms épiphytiques (*Salix* sp., *Callitriche* sp., *Phalaris arundinacea*, *Juncus effusus*, *Mentha aquatica*) obtenus par FESEM et sont assez

représentatives de l'ensemble des prélèvements d'échantillons de biofilms observés durant l'étude (Mai et Octobre 2006).



Biofilm présent sur *Callitriche* sp., (SCIAM,12/06/06)



Biofilm présent sur *Salix* sp., (SCIAM, 12/06/06)

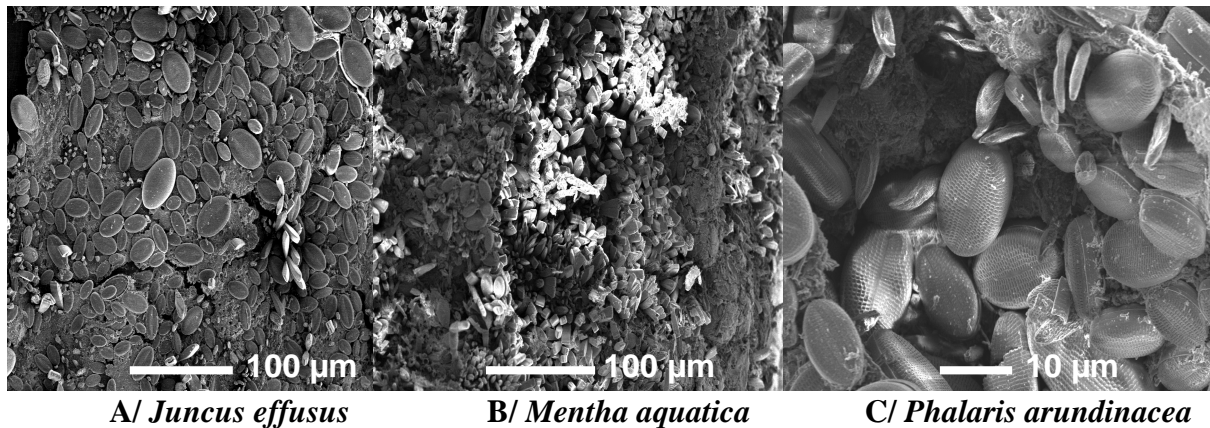


Figure 40 : Observations au MEB des biofilms épiphytiques prélevés in situ (Station TR) (SCIAM, Octobre 06).

Ces résultats préliminaires montrent que le biofilm est présent sur toutes les espèces végétales étudiées. De plus, les communautés d'algues et de diatomées sont fortement représentées au sein de ce dernier. Cependant, les densités entre les espèces varient selon les saisons (Mai et Octobre). En effet, les algues sont prépondérantes durant le printemps et les

diatomées le sont en période automnale et sont accompagnées de nombreux filaments inconnus. Au sein d'une même zone pour une période donnée, les biofilms semblent être assez proches par rapport à tous les échantillons de végétaux observés puisque l'on retrouve majoritairement le genre *Cocconeis* sp. Quelques différences sont mises en évidence notamment sur la tige de *Mentha aquatica* où sont présentes de nombreuses diatomées érigées. Cela est certainement lié à l'hétérogénéité des biofilms d'une part et aussi au temps d'immersion d'autre part. En effet, les diatomées unicellulaires se fixent les premières sur les supports, suivies des formes érigées et filamenteuses (Gold, 2002).

La composition de l'eau étant un paramètre important dans la formation d'un biofilm, un suivi d'algues, de diatomées et de cyanobactéries a été effectué parallèlement sur les biofilms et dans les eaux correspondantes sur 3 stations (AV, ZB et TR).

III.4.2/ Evolution de la composition en algues, en diatomées et en cyanobactéries durant l'année 2007

III.4.2.1/ Evolution des paramètres physico-chimiques au niveau des 3 stations

Les paramètres physico-chimiques influencent la composition du phytoplancton. C'est pourquoi, il est très important de suivre l'évolution de ces paramètres au cours du temps. Le Tableau 18 indique les paramètres physico-chimiques étudiés au cours des mois pendant lesquels un suivi du phytoplancton dans l'eau et sur les biofilms épiphytiques a été effectué.

Tableau 18 : Suivis des paramètres physico-chimiques sur les 3 stations
(le signe - dans le tableau signifie une absence de données)

CHAPITRE III : DIAGNOSTIC SUR LE LAC DE RIBOU

| Paramètres suivis | mars-07 | | | avr-07 | | | ecart type ± |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|
| | Station TR | Station ZB | Station AV | Station TR | Station ZB | Station AV | |
| heure | 15h15 | 14h15 | 12h15 | 16h15 | 11h30 | 13h00 | |
| température °C | 8,9 | 9,6 | 8,7 | 16,2 | 18,1 | 14,5 | 0,1 |
| oxygène mg O ₂ / l | 15,9 | 12,6 | 11,7 | 12,8 | 14,2 | 10,4 | 0,5 |
| % | 137 | 111 | 101 | 130 | 150,1 | 102 | 0,5 |
| conductivité µS / cm | 303 | 273 | 282 | 315 | 271 | 272 | 2 |
| pH unité pH | 8,2 | 7,7 | 7,5 | 8,2 | 8,9 | 8,3 | 0,01 |
| chlorophylle a µg/ l | - | - | - | - | - | - | 0,05 |
| KMnO ₄ mg O ₂ / l | 5,9 | 7 | 7,5 | 7,7 | 6,6 | 8,1 | 0,2 |
| nitrate mg NO ₃ / l | 17 | 16 | 20 | 13 | 13 | 17 | 0,5 |
| ammonium mg NH ₄ / l | <0,02 | 0,041 | <0,02 | 0,062 | 0,32 | 0,129 | 0,001 |
| azote Kjeldahl mg N/ l | 1,2 | 1,5 | 1,4 | 1,7 | 4,3 | 2 | 0,05 |
| phosphates mg PO ₄ / l | 0,11 | <0,1 | 0,24 | 0,1 | <0,10 | <0,1 | 0,05 |
| phosphore mg P/ l | 0,105 | 0,087 | 0,093 | 0,195 | 0,068 | 0,062 | 0,05 |
| COT mg C/ l | - | - | - | - | - | - | 0,2 |
| COD mg C/ l | - | - | - | - | - | - | 0,2 |
| fer mg Fe/ l | - | - | - | - | - | - | 0,05 |
| manganèse mg Mn/ l | - | - | - | - | - | - | 0,05 |
| Paramètres suivis | mai-07 | | | juin-07 | | | ecart type ± |
| | Station TR | Station ZB | Station AV | Station TR | Station ZB | Station AV | |
| heure | 15h45 | 11h00 | 15h30 | 12h05 | 11h | 15h30 | |
| température °C | 13,3 | 16,8 | 13,2 | 16,2 | 19,7 | 16,9 | 0,1 |
| oxygène mg O ₂ / l | 6,3 | 6,3 | 7,9 | 8,7 | 4,6 | 7,6 | 0,5 |
| % | 61 | 66 | 76 | 89 | 51 | 79 | 0,5 |
| conductivité µS / cm | 366 | 288 | 282 | 343 | 289 | 282 | 2 |
| pH unité pH | 7,1 | 7,4 | 7,4 | 7,1 | 7,1 | 7,4 | 0,01 |
| chlorophylle a µg/ l | 17,8 | 13,2 | 3,7 | 7,4 | 17,5 | 7,8 | 0,05 |
| KMnO ₄ mg O ₂ / l | 8,1 | 5,8 | 6,1 | 9,7 | 6,3 | 6 | 0,2 |
| nitrate mg NO ₃ / l | 12 | 9 | 17 | 9 | 6 | 14 | 0,5 |
| ammonium mg NH ₄ / l | 0,063 | 0,458 | 0,085 | 0,108 | 0,289 | 0,083 | 0,001 |
| azote Kjeldahl mg N/ l | 1,9 | 1,8 | 1,2 | 1,9 | 2,3 | 1,5 | 0,05 |
| phosphates mg PO ₄ / l | 0,69 | <0,10 | 0,23 | 0,3 | 0,15 | 0,15 | 0,05 |
| phosphore mg P/ l | 0,403 | 0,127 | 0,077 | 0,316 | 0,115 | 0,108 | 0,05 |
| COT mg C/ l | 10 | 8,9 | 8,5 | 14 | 9,9 | 9,7 | 0,2 |
| COD mg C/ l | 9,5 | 8,1 | 8,2 | 13 | 8,6 | 9 | 0,2 |
| fer mg Fe/ l | 0,524 | 0,6 | 0,144 | 1,02 | 0,424 | 0,286 | 0,05 |
| manganèse mg Mn/ l | 0,058 | 0,293 | 0,055 | 0,076 | 0,125 | 0,107 | 0,05 |

Les résultats montrent que le point d'eau le plus minéralisé correspond à la Zone TR avec des conductivités dépassant les 300 µS/cm tous les mois. Le pH est proche de 8 au niveau de toutes les stations durant mars et avril et proche de 7 en mai et juin. La valeur de l'oxydabilité au KMnO₄ est plus élevée en station AV durant les mois de Mars et Avril et plus élevé dans la station TR en Mai et Juin. Les concentrations en Phosphore, phosphates, COT et COD sont plus importantes dans la station TR. Cela est certainement lié aux apports

anthropiques au niveau du bassin versant. Les taux de chlorophylle *a* traduisant l'activité algale, sont plus élevés dans la zone TR en mai (17,8 µg/L) et dans le lac de Ribou en juin (17,5 µg/L). Les concentrations en azote ammoniacal sont toujours supérieures au niveau de la station du lac de Ribou. Les concentrations en azote Kjeldahl se situent souvent entre 1 et 2 mg/L avec un pic observé à 4,3 mg/L (Avril) sur la station du lac de Ribou. Les concentrations en fer varient de 0,144 mg/L (Station AV en Mai) à 1,02 mg/L (Station TR en Juin) et les concentrations en manganèse atteignent des valeurs maximales dans le lac de Ribou (0,293 mg/L en mai).

L'étude, qui est présentée par la suite, a porté sur l'évolution de la composition en algues, diatomées et cyanobactéries présentes dans l'eau et au sein du biofilm correspondant, au cours du temps sur un même support végétal : *Phalaris arundinacea*. Cette espèce a été choisie car elle était présente sur les 3 stations de prélèvements d'une part et elle est intéressante d'un point de vue épuratoire d'autre part comme il a été montré dans la littérature (Picard et coll, 2005, Steinmann et coll, 2003).

III.4.2.2/ Dans l'eau et sur le support végétal : *Phalaris arundinacea*

La Figure 41 représente des abondances relatives entre les algues, les diatomées et les cyanobactéries au sein des 3 stations étudiées au cours du temps. Dans chaque cas, un suivi est effectué parallèlement au niveau des biofilms et dans l'eau.

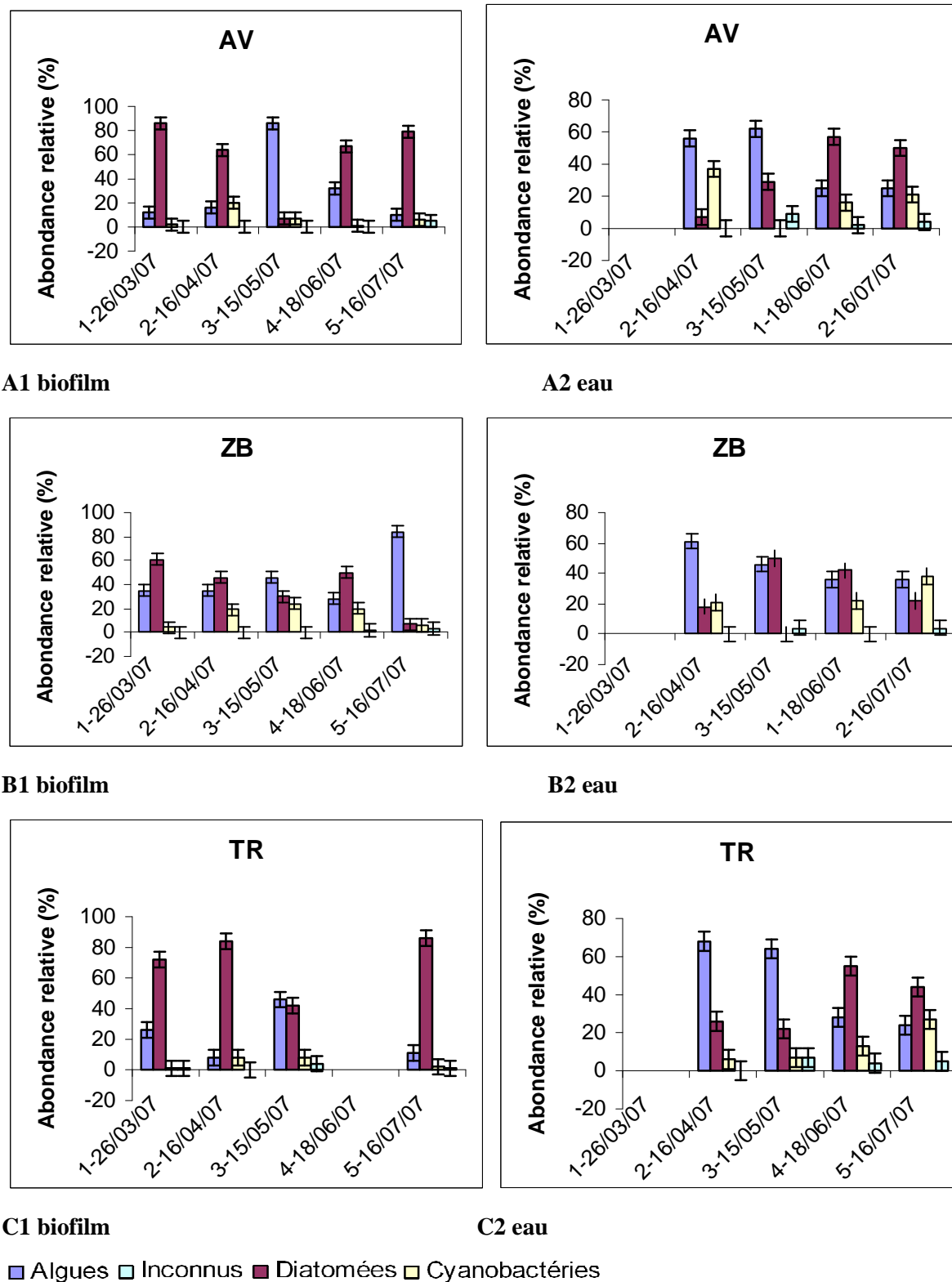


Figure 41 : Histogrammes représentant l'abondance relative entre les algues, les diatomées et les cyanobactéries au sein des biofilms épiphytiques et dans l'eau au niveau des 3 stations en fonction des dates de prélèvements.

La Figure 41 montre que dans les trois cas considérés, il faut remarquer des différences d'évolution des proportions entre les communautés étudiées entre l'eau et le biofilm. En général, au niveau des 3 stations, les proportions d'algues sont majoritaires dans l'eau à partir du mois d'avril (16/04/07) avec un pic de cyanobactéries observé dans l'eau issue de la station AV. Les diatomées restent majoritaires dans le biofilm. C'est à partir du 15 Mai 2007 que les proportions d'algues (autres que les diatomées) deviennent plus importantes dans tous les biofilms. En 2006, durant la même période, cette tendance avait déjà été observée au niveau de la station TR (paragraphe III.4). De plus, nous observons un décalage très marqué, au niveau de la station TR et AV, entre la composition de l'eau et celle du biofilm laissant supposer que les algues se développeraient majoritairement dans l'eau avant de se retrouver dans un biofilm, dans nos conditions. Par la suite, les diatomées sont à nouveau prépondérantes aussi bien dans l'eau que dans le biofilm excepté au niveau de la station ZB en Juillet où les algues représentent environ 80 % des communautés et restent majoritaires avec les cyanobactéries dans l'eau de cette station.

Les cyanobactéries sont retrouvées dans les eaux, dans de plus faibles proportions que les deux autres communautés, excepté en Avril et en Juillet (période de bloom). En effet, ces dernières peuvent représenter jusqu'à 30 % par rapport aux autres taxons étudiés dans les eaux et ne dépassent jamais 20 % dans les biofilms. Il faut noter qu'au niveau de la station TR, à partir du mois de juin, les cyanobactéries représentent une part non négligeable dans l'eau par rapport aux deux autres communautés. Les biofilms contiennent des proportions moins importantes de cyanobactéries au sein de la station TR, qui reste cependant la station la plus anthropisée. Cette étude a montré des différences entre la composition de l'eau et celle du biofilm. Cependant, dans nos conditions, le temps d'immersion n'est pas maîtrisé. C'est pourquoi, il a semblé pertinent de choisir un support inerte, qui n'évolue pas au cours du temps, afin de mieux comprendre comment s'effectuait la colonisation *in situ* sur environ 2 mois d'expérimentation. Ces derniers ont été installés sur les 3 stations de prélèvements.

III.4.2.3/ Dans l'eau et sur le support en bambou

Plusieurs supports bambous ont préalablement été installés à chaque station. Lors de chaque prélèvement un seul support est récupéré et les autres sont laissés dans l'eau. Dans notre approche, il est considéré que tous les supports sont colonisés de manière similaire puisqu'ils sont en contact avec le même « type d'eau ». La Figure 42 représente des abondances relatives entre les algues, les diatomées et les cyanobactéries au sein des 3

stations étudiées au cours du temps. Dans chaque cas, comme précédemment, un suivi est effectué parallèlement au niveau des biofilms et dans l'eau.

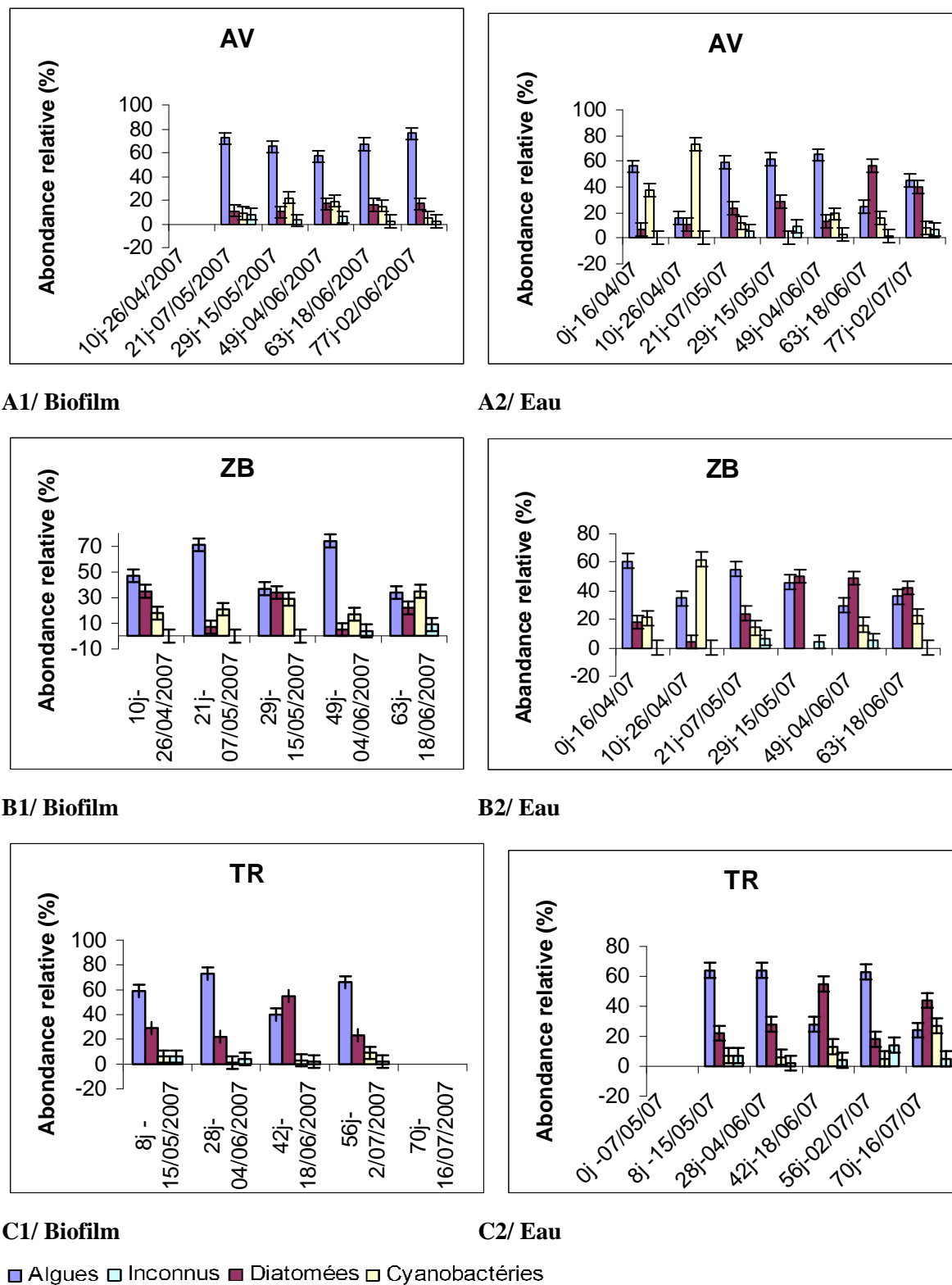


Figure 42 : Abondance relative entre les algues, les diatomées et les cyanobactéries au sein des biofilms et dans l'eau au niveau de 3 stations en fonction du temps d'immersion des supports bambous

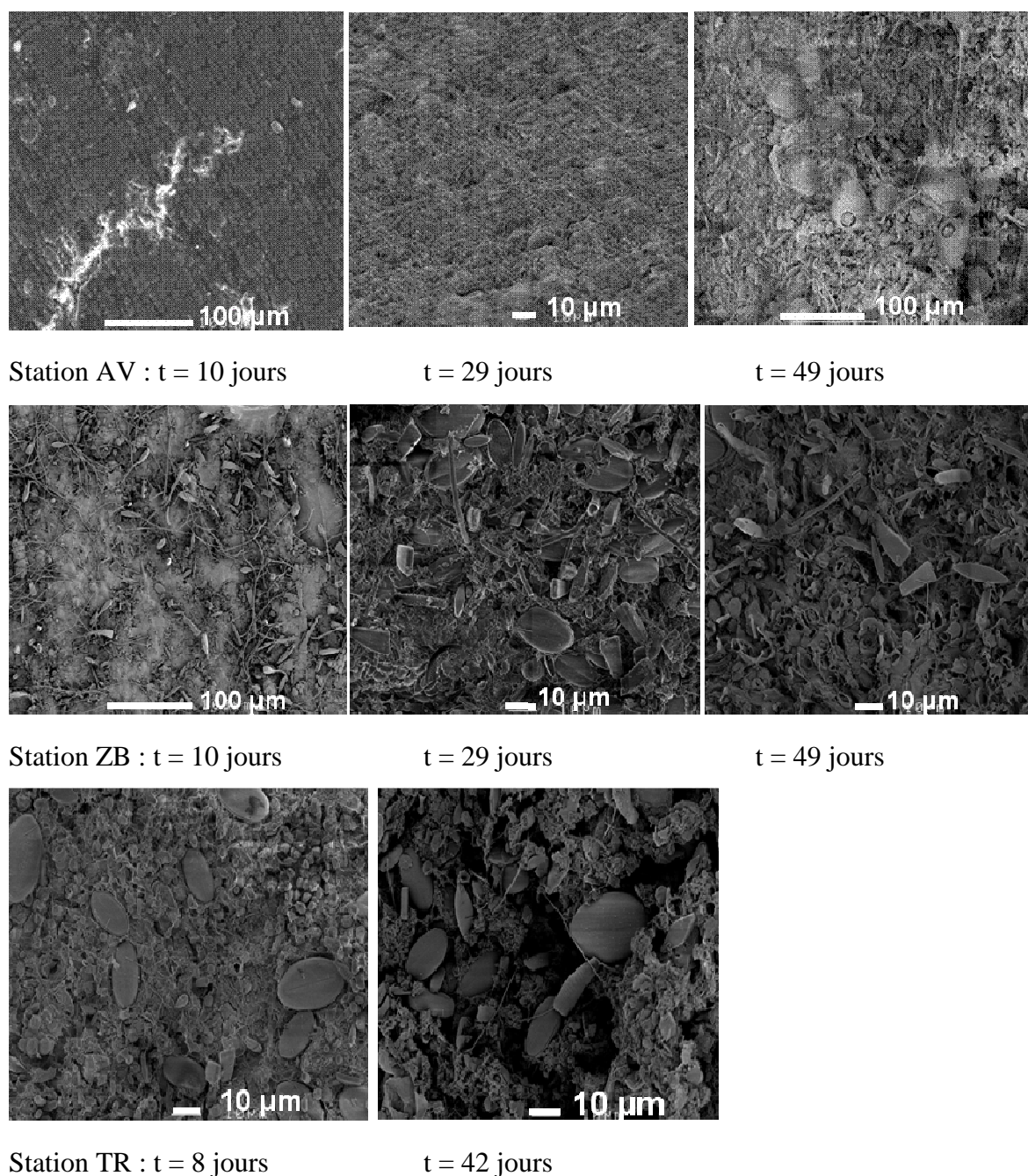


Figure 43 : Illustration de l'évolution des biofilms naturels sur supports bambous

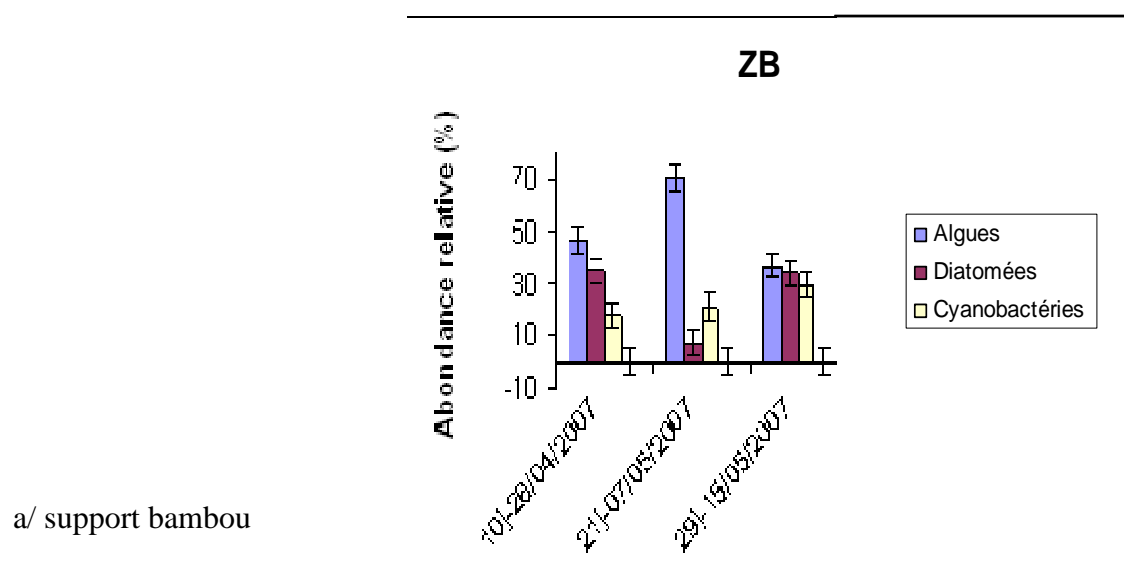
La Figure 42 montre des proportions différentes au sein des communautés selon les stations et la période de prélèvement. Dans la plupart des cas, les algues représentent la part majoritaire par rapport aux deux autres taxons. Ces résultats sont cohérents avec les biofilms épiphytiques. En effet, l'étude a débuté au moment où les algues devenaient prépondérantes dans l'eau (fin avril, début mai). De plus, par le biais de ces résultats nous confirmons que les cyanobactéries ne sont jamais majoritaires au sein des biofilms même dans le cas où elles sont

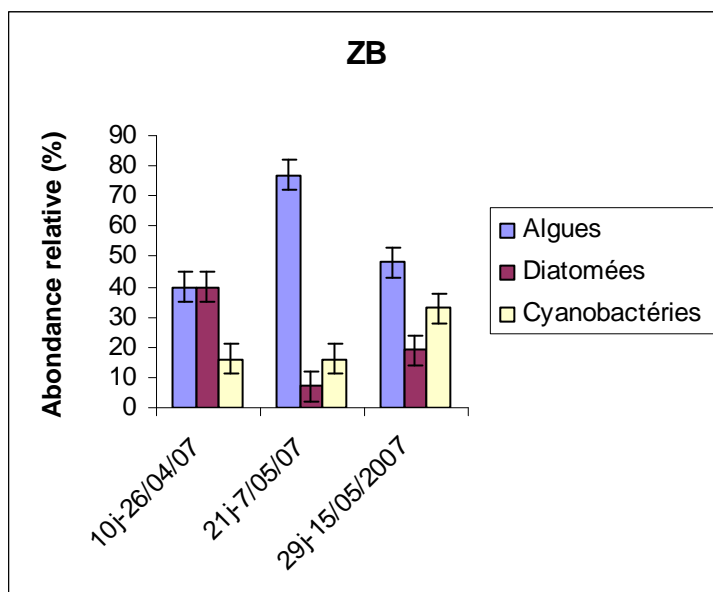
prépondérantes dans l'eau. Comme pour les biofilms épiphytiques, les proportions de cyanobactéries par rapport aux algues et aux diatomées, sont plus importantes au sein des stations AV et ZB. Ces résultats montrent que le développement des cyanobactéries est plus propice au niveau de ces deux stations.

La Figure 43 illustre l'influence de l'eau sur les supports plantés au sein des 3 stations. Un suivi de la colonisation des supports est alors effectué. Le temps de colonisation diffère selon les stations, en effet, à t=10 jours, les supports plantés au niveau de la station AV ne sont pas colonisés alors qu'au niveau de la station ZB, un biofilm est déjà constitué avec présence de diatomées (*Gomphonema* sp.) en surface. Après 8 jours de colonisation, la surface du support issu de la station TR n'est plus visible. Ces résultats montrent que le biofilm est plus développé sur ce support immergé dans l'eau de cette station qui est la plus anthropisée. Le temps de colonisation des supports dépend alors de la composition de l'eau. Chaque biofilm semble être caractéristique d'une eau donnée. Néanmoins, dans une même zone, le support pourrait jouer également un rôle au niveau de sa colonisation par les biofilms.

III.4.2.4/ Influence du support sur la colonisation.

L'étude a porté sur l'influence du support lors de la colonisation par les biofilms. La Figure 44 montre l'abondance relative entre cyanobactéries, diatomées et algues (%) en fonction du temps de colonisation sur supports bambous (a) et plastiques (b) plantés au niveau de la station ZB.





b/ support plastique

Figure 44 : Influence du support sur la colonisation par les algues, les diatomées et les cyanobactéries.

La Figure 44 montre que l'évolution des abondances relatives entre les espèces étudiées est « quasi-similaire » au cours du temps sur les 2 types de supports utilisés. Une différence plus marquée apparaît lors du 29^{ème} jour de colonisation et que l'on peut attribuer à l'hétérogénéité des biofilms. Nous nous sommes alors intéressés à la composition chimique des biofilms car dans un biofilm naturel les éléments chimiques (métaux) y sont fortement représentés (Hiernaux, 2005).

III.4.3/ Suivis de la composition chimique des biofilms

Ce paragraphe traite de la partie minérale des biofilms car cette dernière intervient dans sa structuration (Hiernaux, 2005). Des études par microanalyses X (EDX) ont été réalisées afin de mieux comprendre la composition des biofilms naturels en étudiant les proportions et la répartition des éléments chimiques au sein des biofilms.

III.4.3.1/ L'analyse semi-quantitative par EDX

III.4.3.1.1./ Analyse sur des tiges de baldingères

Dans un premier temps, une identification des éléments chimiques présents au sein du végétal étudié est nécessaire car l'analyse EDX permet une étude de surface, par conséquent,

il est difficile de discriminer les espèces chimiques issues de la plante et ceux issus des biofilms. C'est pourquoi, il est important de connaître les composés chimiques retrouvés au sein de l'hélophyte *Phalaris arundinacea*. La Figure 45 représente les proportions des éléments chimiques (abondance atomique) retrouvés au sein de la plante. Nous remarquons d'avance que le Mg, le P, le S, le Cl, le K, et le Ca, font partie intégrante du végétal en revanche, le Mn, le Fer, le Si et l'Al ne sont pas mis en évidence dans les végétaux. Dans un premier temps, une attention plus particulière sera portée sur ces éléments.

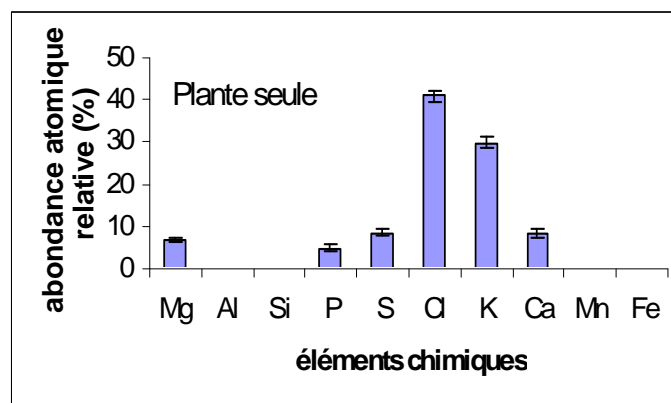
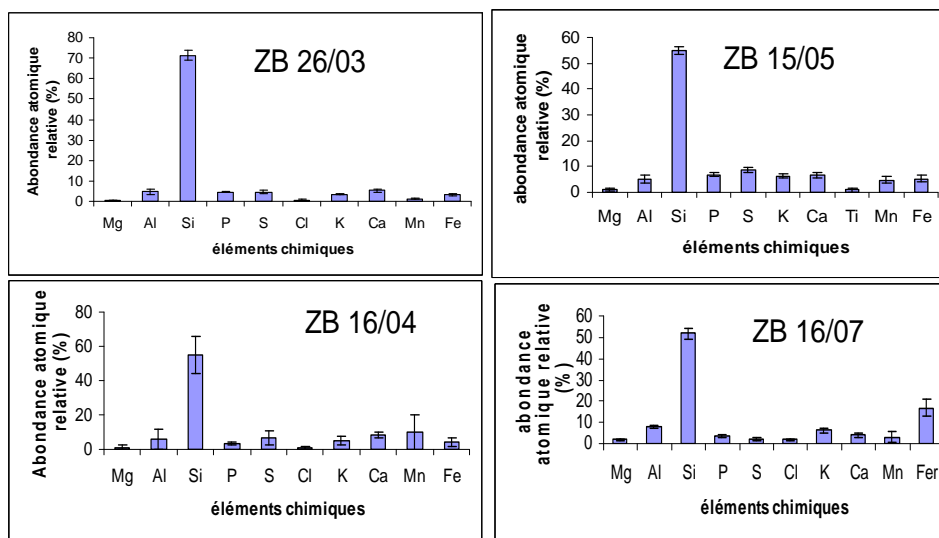


Figure 45: Proportions des éléments chimiques présents au sein de l'espèce *Phalaris arundinacea*.

La Figure 46 met en évidence les proportions des éléments chimiques présents à la surface d'une tige immergée de l'espèce *Phalaris arundinacea* avec du biofilm.



a/ ZB

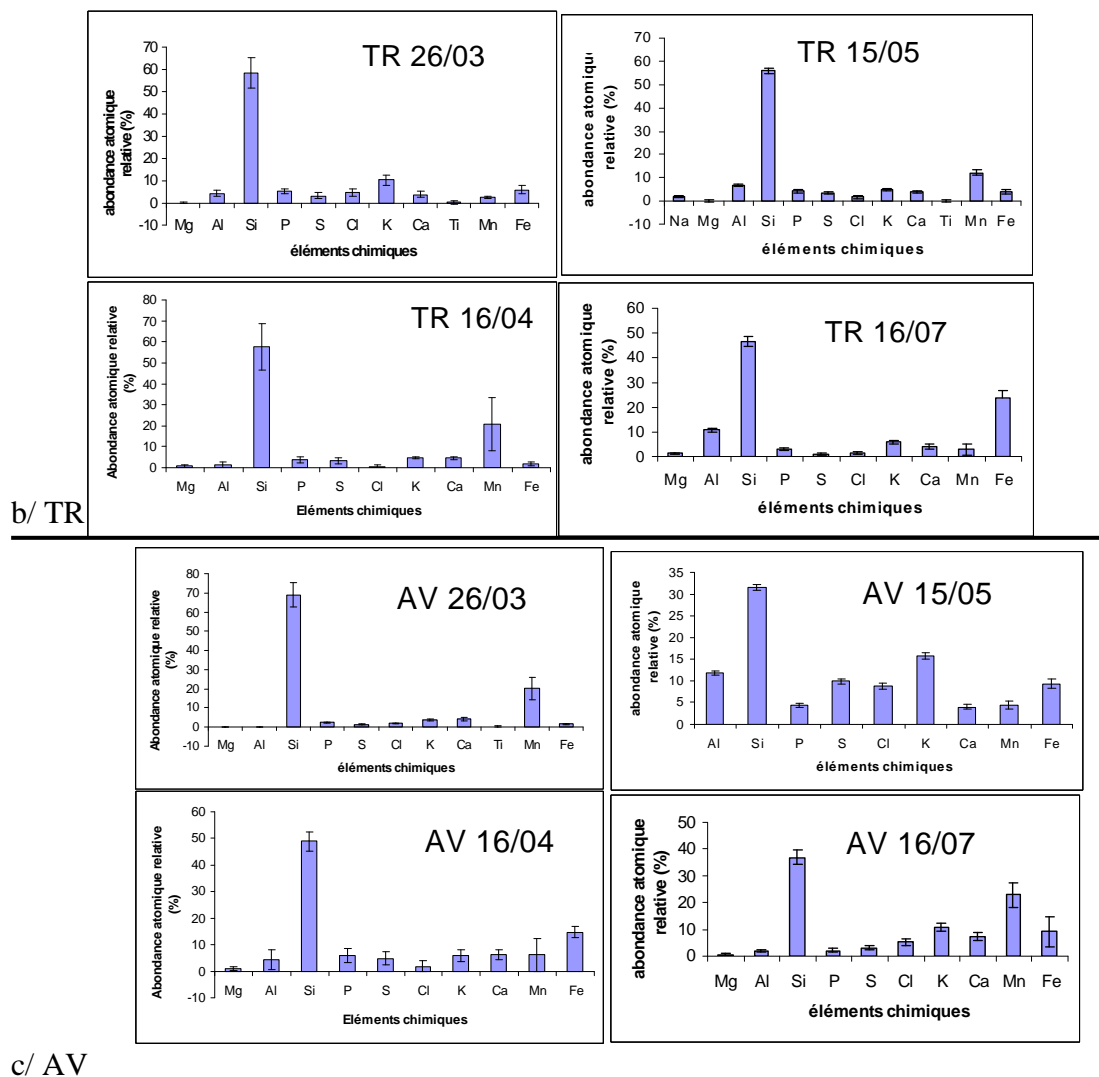


Figure 46 : Proportions des éléments chimiques présents à la surface d'une tige immergée de l'espèce *Phalaris arundinacea* avec du biofilm.

La Figure 46 montre que des éléments chimiques comme l'Al, le Si, le Mn et le Fer apparaissent au sein de la surface du végétal. Leurs présences sont directement issues du biofilm car ces éléments n'apparaissent pas à l'analyse EDX effectuée à la surface de l'hélophyte. Les éléments les plus souvent retrouvés sont le silicium, le fer et le manganèse. Ces résultats montrent que le silicium, indépendamment de la station de prélèvement, est toujours très majoritaire par rapport aux autres éléments chimiques. Cela est fortement attribué à la présence de diatomées. Cependant, les proportions des éléments chimiques changent selon les mois de prélèvements, par conséquent, elles changent selon le biofilm. Comme le temps d'immersion n'est pas contrôlé, il est probable que les variations des proportions de chaque élément chimique soit dépendantes du temps de colonisation. Dans l'optique de mieux suivre l'évolution des proportions de ces éléments au cours du temps, des

supports bambous séchés sont utilisés. Ces derniers sont à la fois rigides et inertes par conséquent, ils ne se déforment pas au contact de l'eau. De plus, l'utilisation de ces supports permet de s'affranchir des échanges entre le « végétal vivant » et le biofilm. L'inconvénient de ce support est sa richesse en Silicium. Toutefois, il ne contient pas d'autres éléments exceptés le P (1 % atomique).

III.4.3.1.2./Analyse sur supports de Bambous séchés

Plusieurs supports ont été introduits au niveau de la station ZB, AV et TR. Ces derniers sont prélevés individuellement à chaque campagne pour chaque station, pendant que les autres supports sont laissés immergés. Pour un point donné, les supports ont été installés le même jour afin de contrôler le temps d'immersion.

La Figure 47 met en évidence l'évolution des proportions des éléments chimiques présents au sein d'un biofilm constitué à la surface d'un support bambous immergé.

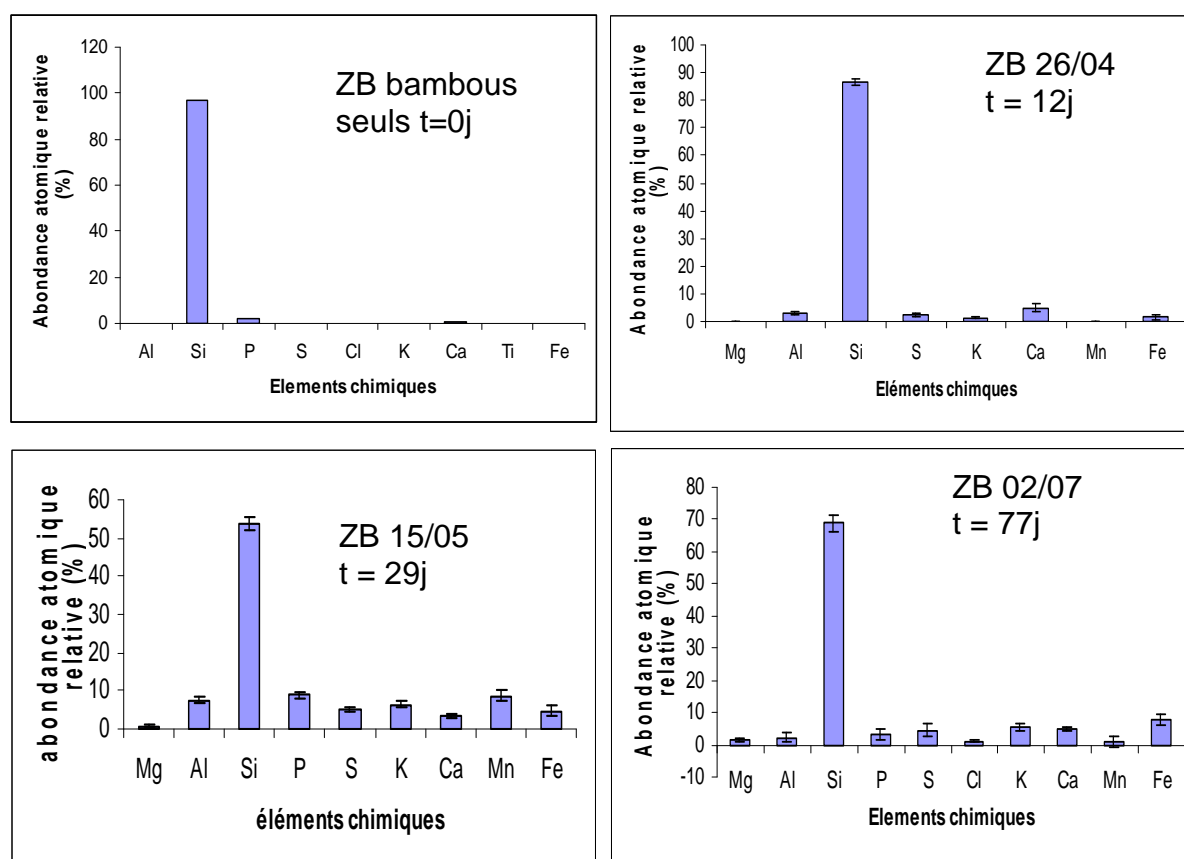


Figure 47 : Evolution des proportions des éléments chimiques présents au sein d'un biofilm à la surface d'un support bambou immergé (ZB).

La Figure 47 montre que dans cette zone, les éléments chimiques prématurément retrouvés (12j) sont l'Al, S, K, Ca et Fe. Lors de l'étude, le Si étant déjà incorporé au support,

ce dernier ne sera pas étudié. Les proportions de calcium sont plus importantes après 12 jours de colonisation, par conséquent, ce dernier est intégré au biofilm. Après 29 jours de colonisation, il apparaît que le Mn et le P sont présents dans des proportions non négligeables. Après 77 jours d'immersion (fin de l'expérience : 2 juillet 2007), l'élément chlore apparaît au sein de tous les autres éléments. Cependant, les proportions des composés chimiques évoluent fortement, notamment, le Mn ne représente plus que 1 % des éléments chimiques totaux. Ces résultats montrent que pour une même station, la composition chimique à la surface des biofilms évolue au cours du temps. Les résultats sont ainsi confirmés par la Figure 48, qui indique l'évolution des proportions de ces éléments présents au sein d'un biofilm à la surface de supports bambous immergés (station AV et TR).

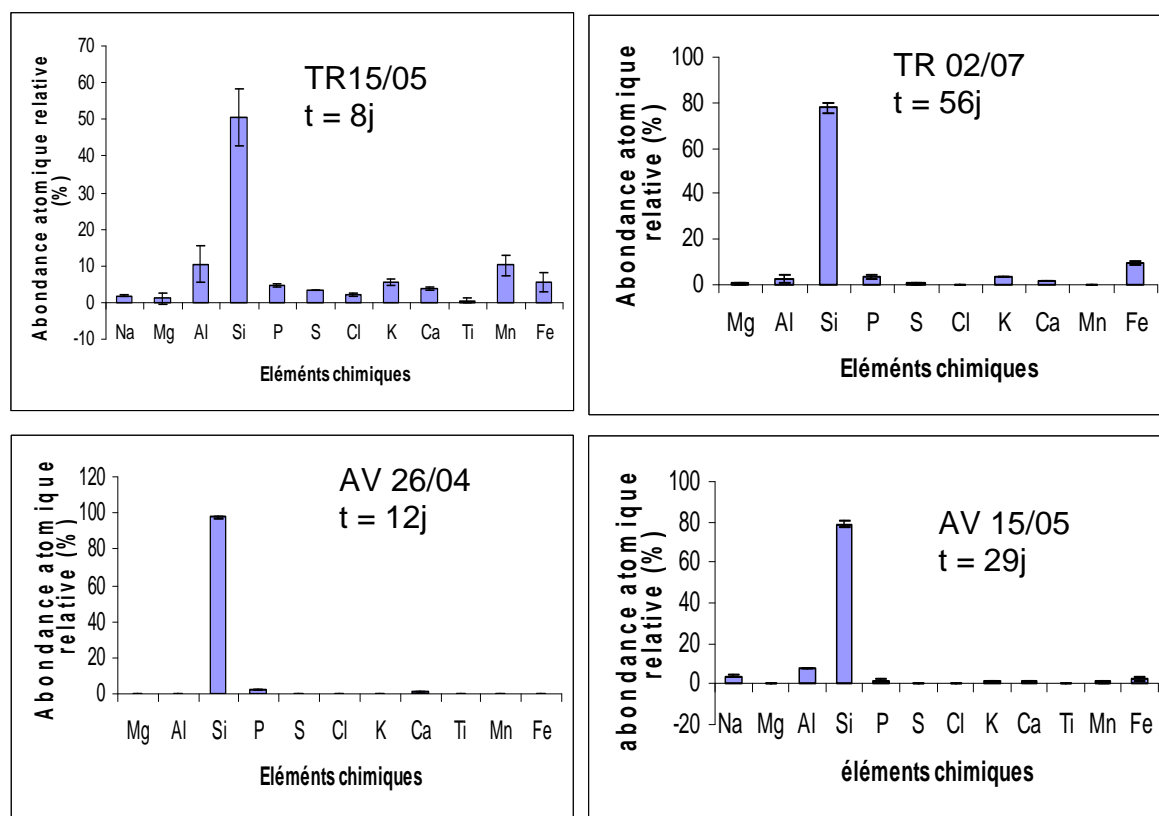


Figure 48 : Evolution des proportions des éléments chimiques présents au sein d'un biofilm à la surface d'un support bambou immergé (AV et TR).

La Figure 48 montre que l'élaboration des biofilms sur les supports est différente selon la station. En effet, au niveau de la station AV, après 12 jours d'immersion, le support n'a pas été colonisé et seulement après 29 jours, quelques éléments chimiques apparaissent notamment le Fer, le Mn, l'Al et le Na, le K alors qu'au niveau de la station TR, après 8 jours seulement, le support a été colonisé en faisant apparaître 11 éléments (Silicium exclu) avec majoritairement du Mn et de l'Al. Les résultats ont montré que la présence et les proportions

des composés chimiques sont variables selon le temps d'immersion et les stations de prélèvements, par conséquent, selon les eaux de surface. L'incorporation des éléments chimiques au sein des biofilms, est dépendante des stations étudiées.

III.4.3.1.3/ Analyse sur supports plastiques

La Figure 49 montre un biofilm qui s'est développé sur un support plastique installé au niveau de la station ZB (1 mois de contact).

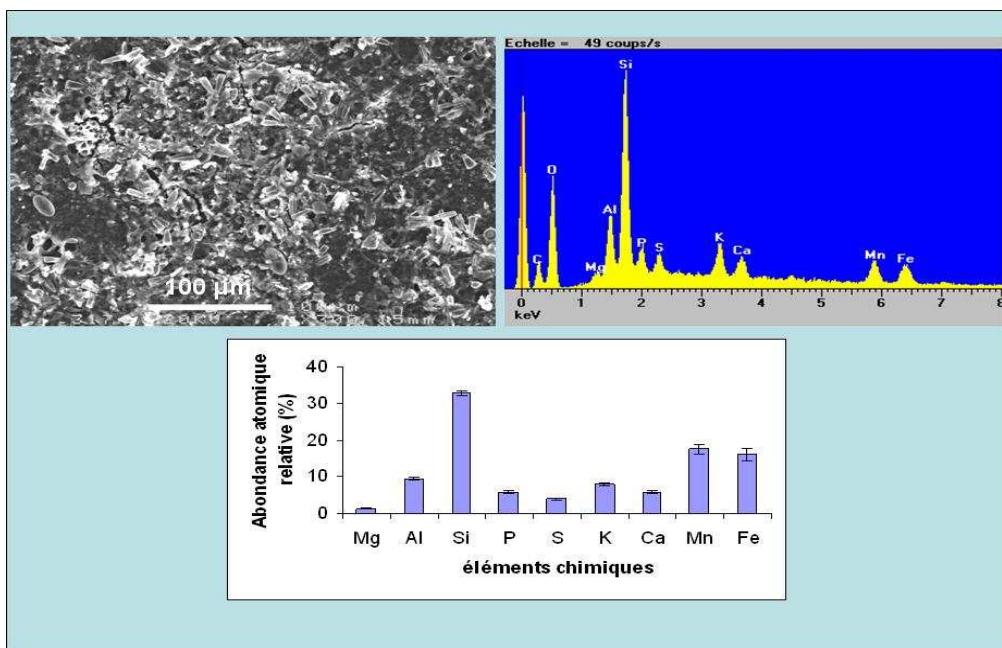


Figure 49 : Composition chimique d'un biofilm issu d'un support plastique

La Figure 50 montre un spectre EDX du support plastique.

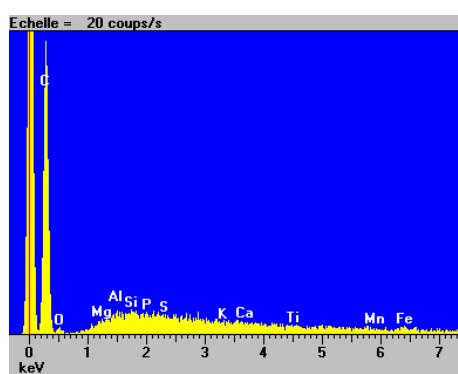


Figure 50 : Spectre EDX du support plastique

Le support plastique a permis de mettre en évidence tous les éléments chimiques du biofilm au niveau de la station ZB car la surface du support ne contient aucun de ces éléments à l'exception de l'oxygène et du carbone. Comme précédemment, les éléments chimiques

retrouvés dans le biofilm sont les suivants : le magnésium, l'aluminium, le silicium, le phosphore, le soufre, le potassium, le calcium, le manganèse et le fer. Ces résultats sont corrélés avec ceux obtenus sur les supports bambous ayant eu un même temps d'immersion dans l'eau. Au sein des biofilms, certains éléments sont présents sous formes d'oxydes (fer, aluminium, manganèse) comme il est décrit dans la littérature (Hiernaux, 2005). Ces éléments doivent intervenir dans la structure du biofilm et aussi dans les processus rédox.

Les analyses EDX de la surface au cours du temps ont permis de montrer l'influence du temps de colonisation sur l'évolution des proportions entre tous les éléments chimiques présents à la surface des biofilms. Par conséquent, l'étude suivante a alors porté sur la répartition des éléments chimiques au sein d'un biofilm.

III.4.3.2/ Etude de la répartition par élément chimique

Cette approche est possible grâce à la microanalyse X qui a permis de réaliser une cartographie par élément chimique. Les Figures 51 à 56 montrent la répartition des principaux éléments chimiques retrouvés dans les biofilms épiphytiques issus des stations (Mn, Si, Al, Fe, Ca, S, K, P, Cl) et obtenus par microanalyses X.

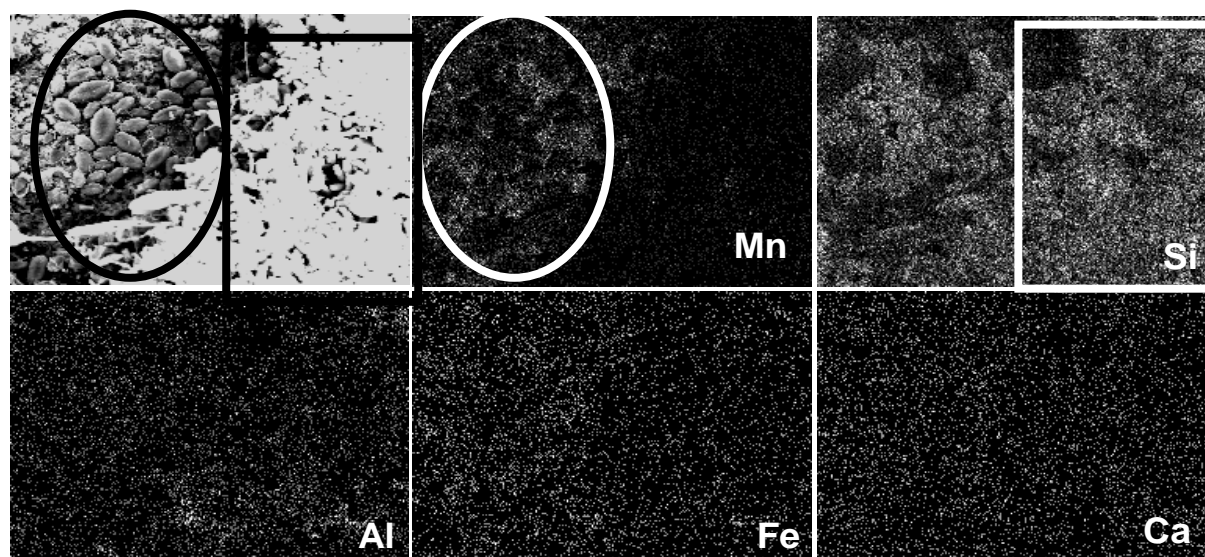


Figure 51 : Répartition des éléments chimiques majeurs (Mn, Si, Al, Fe , Ca) au sein de biofilms par microanalyses X (date du prélèvement Mars 2007, Station ZB)

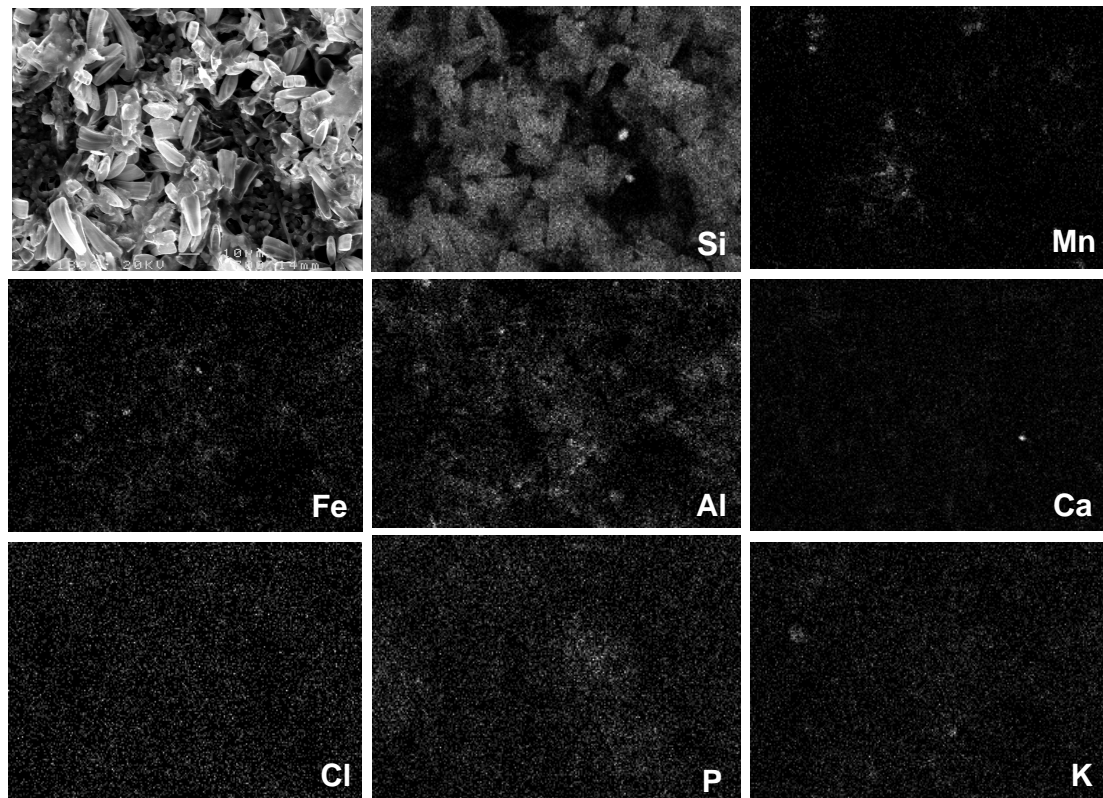


Figure 52 : Répartition des éléments chimiques (Si, Mn, Fe, Al, Ca, Cl , P, K) au sein de biofilms par microanalyses X (date du prélèvement Mars 2007, Station ZB)

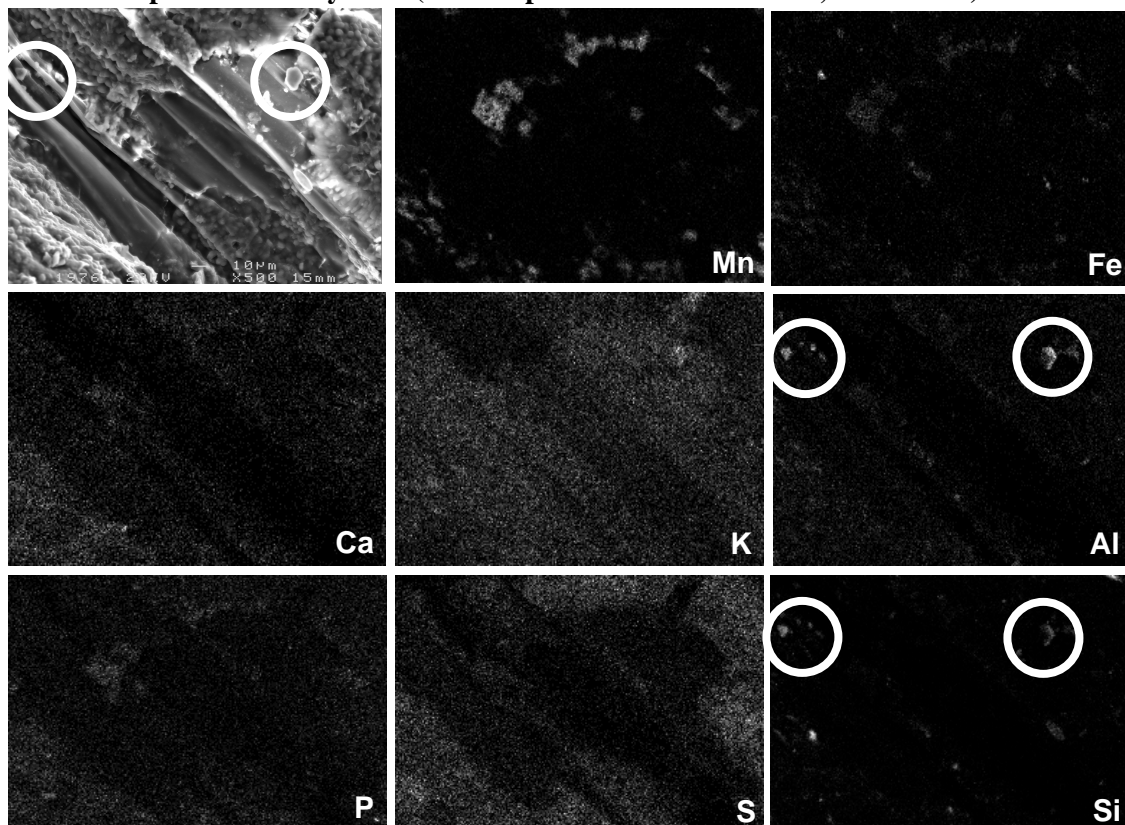


Figure 53 : Répartition des éléments chimiques (Si, Mn, Fe, Al, Ca, S , P, K) au sein de biofilm par microanalyses X (date du prélèvement Mars 2007, Station ZB)

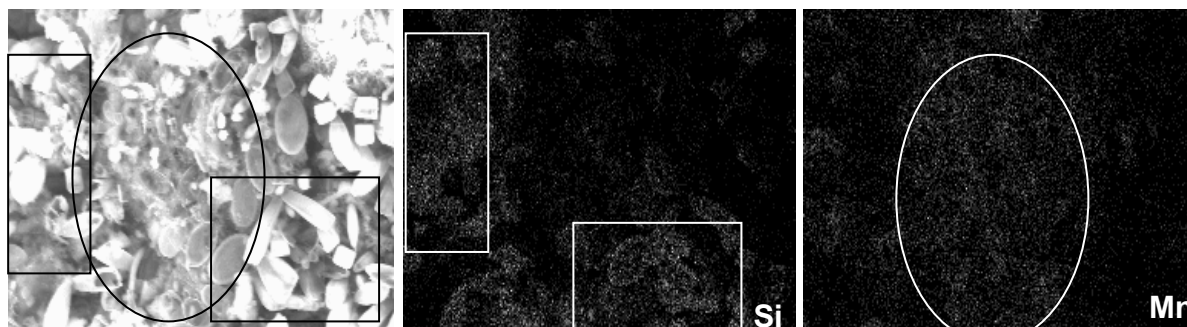


Figure 54 : Répartition des éléments chimiques (Si, Mn) au sein de biofilm par microanalyses X (date du prélèvement Octobre 2006, Station TR)

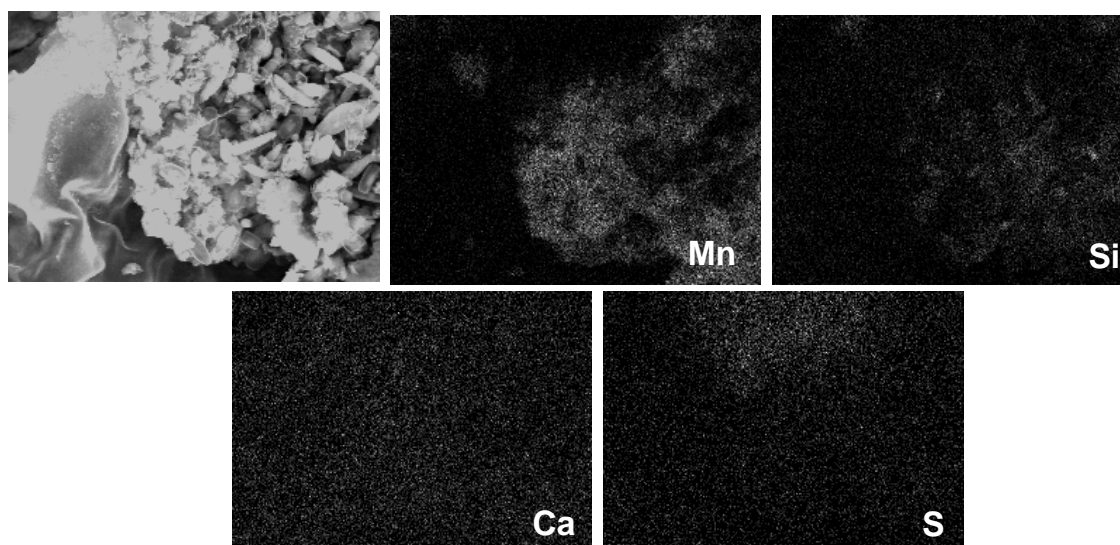


Figure 55 : Répartition des éléments chimiques (Mn, Si, Ca, S) au sein de biofilm par microanalyses X (date du prélèvement Octobre 2006, Station TR)

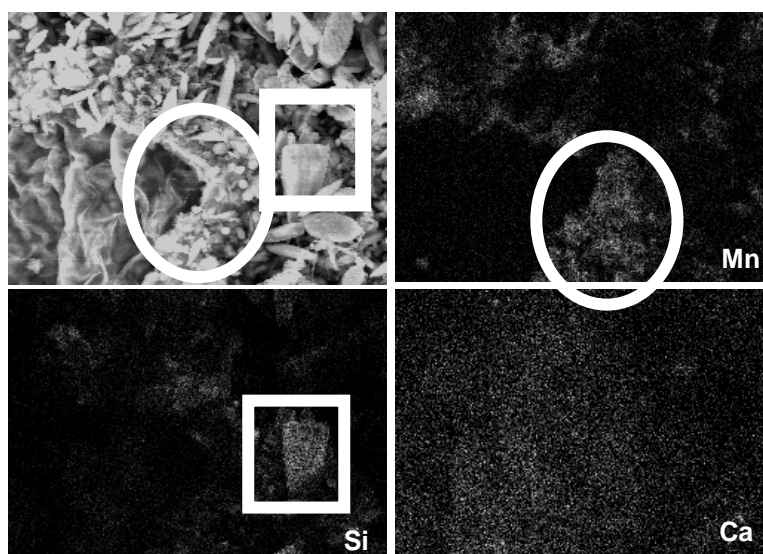


Figure 56 : Répartition des éléments chimiques (Mn, Si, Ca) au sein de biofilm par microanalyses X (date du prélèvement Octobre 2006, Station TR)

Les Figures 51 à 56 montrent que les biofilms présentent une hétérogénéité. Certaines de ces figures mettent en évidence que la présence de manganèse apparaît plus marquée sur les premières couches du biofilm alors que lorsque la colonisation par les diatomées est plus importante (Figure 51 : accentuation par le contraste de l'image, en blanc à droite ; Figure 54, 55 et 56 : le silicium est indiqué avec des rectangles et le Mn est indiqué avec des cercles (localisation des points blancs), le manganèse apparaît moins présent. Lors des premières étapes de formation du biofilm, les bactéries sont les principales « colonisatrices » dont certaines sont capables d'oxyder le manganèse (Miyata *et coll*, 2007). Le Mn ainsi incorporé sous forme dissoute (forme Mn^{2+} dans les eaux naturelles) au sein du biofilm s'oxyde majoritairement en MnO_2 (Miyata *et coll*, 2007). L'incorporation du Mn sur les premières couches serait liée à la présence des bactéries, d'autant plus que sur toutes les observations réalisées au cours des 6 derniers mois, le manganèse était surtout présent sur ces premières couches de biofilm. Au sein d'amas de diatomées (Figure 51, Mn, droite), le manganèse n'apparaît pas ou peu à l'analyse EDX. Sur ces zones, les bactéries sont moins présentes. Les bactéries semblent jouer un rôle plus important que les diatomées dans l'incorporation du Mn au sein d'un biofilm. Il faut noter que lorsqu'un biofilm est suffisamment épais, le faisceau d'électrons (pénétration de quelques micromètres dans la matière) n'atteint pas les premières couches de la « matrice » qui sont colonisées par les bactéries. Par conséquent, le manganèse qui est très présent dans les premières couches n'est pas mis en évidence.

Parmi les autres éléments, le silicium est aussi présent au niveau des diatomées puisqu'il est le principal élément constitutif de leurs parois (Germain, 1981). De ce fait, en se référant aux résultats de microanalyse X, la présence de diatomées contribue fortement à la présence de silicium au sein d'un biofilm.

L'Al est présent sur toute la surface. Cependant, il est souvent très présent dans les zones des biofilms riches en diatomées (Figure 51). L'Al pourrait se lier aux diatomées (parois de silicium). En effet, il existe dans la nature de nombreux complexes à base de Si et d'Al, comme nous l'observons sur la Figure 53 (cercles blancs) par conséquent, il semblerait alors possible que des complexes Si-Al puissent également se constituer sur les parois des diatomées.

Le Ca, le S et le P sont aussi retrouvés dans les biofilms. Bien que ces éléments soient constitutifs des plantes, ces derniers apparaissent dans les zones en présence de biofilms (Figure 53). Le S, le P sont également des constituants des microorganismes en général et le Ca intervient également dans les processus métaboliques de ces derniers.

Le fer est retrouvé sur toutes les couches du biofilm en présence ou non de diatomées (Figure 51 et 52). De plus, le fer peut apparaître très présent sur les premières couches de formation du biofilm surtout en période estivale. Cela dépend certainement de la concentration et de la spéciation de cet élément contenu dans l'eau et dans les biofilms. En effet, les résultats obtenus lors de la campagne de prélèvement de juillet 2006 mettent en évidence la présence de fer sur les biofilms épiphytiques. La Figure 57 met en évidence la composition chimique de la surface d'un biofilm épiphytique observé au MEB/EDX.

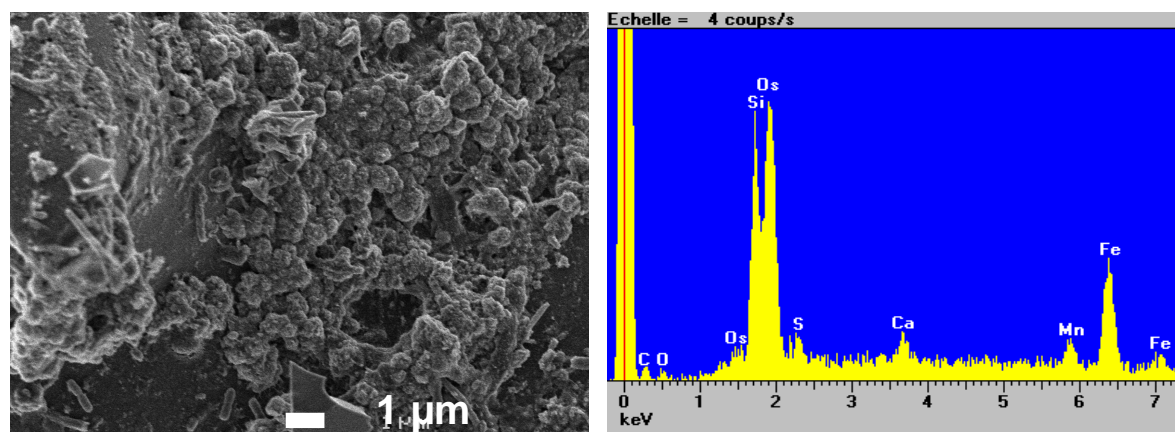


Figure 57 : Analyse MEB/EDX d'un biofilm épiphytique

(Prélèvement juillet 2006 : Concentration en Fe dans l'eau : 3,59 mg/L ; en Mn : 2,14 mg/L, Oxygène dissous : 2 mg/L)

La Figure 57 montre que le milieu est plutôt réducteur car la concentration en oxygène est de 2 mg/L, ce qui peut s'expliquer par le fait que la zone est recouverte de lentilles d'eau (*Lemna minor*). Il faut noter des concentrations en fer (3,59 mg/L) et en manganèse (2,14 mg/L) élevées par rapport aux autres campagnes de prélèvements. Comme le milieu est appauvri en O₂, un relargage des sédiments de ces éléments est fortement probable. En effet, en milieu réducteur, le Fer III sous forme d'oxydes est réduit en Fer II soluble dans l'eau. Les concentrations importantes en fer dans l'eau peuvent expliquer les observations obtenues au sein du biofilm (présence d'un pic à 6,5 keV correspondant au Fe, Figure 57 spectre). Ces résultats sont corrélés avec les proportions de fer au niveau des bambous sur certaines stations (TR et ZB) qui augmentent lorsque le biofilm est exposé aux eaux estivales. La présence d'osmium et de silicium est liée au traitement du biofilm effectué pour l'observation au MEB.

Conclusion partielle

Cette étude a permis de mettre en évidence des biofilms sur 11 végétaux présents *in situ*. Les biofilms semblent spécifiques des trois stations de prélèvements d'un point de vue microbiologique et chimique. En effet, les proportions entre les algues, les diatomées et les cyanobactéries varient au cours du temps et selon les stations. Durant le printemps, les algues se développent dans l'eau et apparaissent dans le biofilm avec les cyanobactéries qui ne sont jamais majoritaires dans ce dernier. De plus, cette étude a également abouti à une meilleure compréhension de la répartition des éléments chimiques dans un biofilm épiphytique. Les proportions de ces éléments sont variables au cours du temps et aussi selon les stations. En effet, nous avons montré que les biofilms élaborés directement au niveau de la station TR qui est la plus anthropisée, le biofilm se formait plus rapidement (8 jours). **Tous ces résultats laissent supposer que le biofilm apparaît comme un marqueur du milieu naturel qui est certainement lié à une qualité d'eau.**

Contrairement à des analyses d'eaux qui sont trop ponctuelles, les biofilms épiphytiques étant la résultante d'une eau qui a évolué au cours du temps, pourraient permettre un meilleur diagnostic grâce à la présence des différents taxons (algues, diatomées, cyanobactéries) et aux espèces chimiques (Fe, Mn, Si, Ca, P) qui les composent. En plus de l'aspect diagnostic, les biofilms doivent aussi apporter leurs contributions dans l'amélioration de la qualité d'une eau (Bourgues et hart, 2007 ; Quintelas et coll, 2009).

Sachant que les biofilms épiphytiques contiennent de nombreuses espèces chimiques comme le Fe, Mn, Si, Ca et bien d'autres, nous avons supposé que l'incorporation de ces éléments dans le biofilm contribuerait simultanément à leurs éliminations dans les eaux correspondantes. Comme l'étude directe au sein d'un milieu naturel ne permet pas d'évaluer les potentialités épuratoires des biofilms épiphytiques, une étude des biofilms en milieu contrôlé, au sein d'un bioréacteur, s'est avérée essentielle dans le but de mieux comprendre l'évolution des biofilms au cours du temps et leurs impacts sur les eaux naturelles.

CHAPITRE IV : IMPACTS DES BIOFILMS SUR DES EAUX NATURELLES ANTHROPISEES

Ce chapitre traite de l'impact d'un biofilm élaboré en laboratoire dans un bioréacteur sur la composition d'une eau naturelle, elle-même utilisée pour son élaboration. Afin de s'affranchir de la complexité des interactions entre les macrophytes et les biofilms, seuls ces derniers ont fait l'objet d'études sur supports inertes (billes de verre). Le choix des billes de verre est judicieux pour plusieurs raisons. D'une part, les billes de verre sont des supports inertes, par conséquent, aucun apport d'alimentation du biofilm autre que l'eau n'est possible alors que les végétaux exsudent des molécules. D'autre part, sous forme de billes, une surface de contact suffisamment importante permet de minimiser la taille du bioréacteur. Il est également aisé de récupérer les billes de verre dans le bioréacteur pour réaliser toutes les analyses.

Ce sous-chapitre se divise alors en deux parties et sur chaque partie est exposée l'analyse des paramètres physico-chimiques et microbiologiques comme indiqué ci-dessous :

- L'étude des eaux

- Suivi des paramètres physico-chimiques
- Suivi des paramètres microbiologiques

- L'étude des biofilms

- Analyse des paramètres physico-chimiques
- Analyse des paramètres microbiologiques

Etude des eaux

Dans un premier temps, l'étude porte sur l'évolution de la matière organique dans l'eau au cours du temps. Cette MO est modifiée lors de l'élaboration du biofilm.

Les paramètres suivis sont le COT et COD dans les eaux brutes puis dans les eaux fractionnées. L'étape de fractionnement a pour objectif de montrer l'évolution de COD dans les différentes fractions des eaux (hydrophobe, transphile et hydrophile).

Des études complémentaires par fluorimétrie 3D permettent d'étudier l'évolution des fluorophores A et T correspondant à des types de substances humiques puis les fluorophores C et T pour mettre en évidence l'activité microbienne.

La pyrolyse GC-MS effectuée sur les extraits solides de HPO et TPH obtenus par lyophilisation a également été utilisée afin de mettre en évidence différents fragments. Ces fragments peuvent être le témoin de la transformation de la MO après passage dans le bioréacteur.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'évolution des éléments majeurs (Ca, Si) et mineurs (P, Mn, Fer) au cours du temps par ICP-OES. Les éléments chimiques au sein des biofilms sont très représentés et contribuent à la structuration des biofilms (Hiernaux, 2005).

Dans un troisième temps, un suivi microbiologique a été effectué dans les eaux (Diatomées, algues, cyanobactéries), ainsi qu'un suivi de population totale bactérienne et l'étude des communautés par biologie GN2.

Etude des biofilms

Pour cette étude, nous rappelons que les biofilms ont été mis en suspensions/solutions de manière identique dans 200 mL d'eau par traitement aux ultrasons (cf chapitre II). Sur ces suspensions/solutions, des mesures de COT, COD (après filtration), d'azote total et de fluorimétrie 3D ainsi que les analyses des métaux (après minéralisation) ont été réalisées par ICP-OES. Les analyses microbiologiques (algues, bactéries, diatomées) et l'étude des communautés par biologie GN2 ont été réalisées de manière identique à celles des eaux. Enfin, après lyophilisation de ces suspensions/solutions, une étude des biofilms par pyrolyse CG-SM a été effectuée.

Les eaux étudiées sont issues des stations **ZB** (prélèvement le 4 mars), **AV** (prélèvement le 17 février 2008) et **TR** (1 eau prélevée le 27 janvier 2008 et une autre eau prélevée le 17 mars 2008 sur cette même station appelée **TR2**) dont les prélèvements ont été effectués pendant la période hivernale durant l'année 2008 (de fin Janvier à mi Mars).

IV.1/ SUIVIS DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DANS LES EAUX AVANT ET APRES PASSAGE AU SEIN DU BIOREACTEUR

IV.1.1/ Evolution des concentrations en COT, COD, et d'azote total et dissous au sein des eaux étudiées

La Figure 58 montre l'évolution du COT, du COD, de l'azote total et de l'azote dissous sur les différentes eaux testées en entrée, en sortie et dans le réservoir de récupération. Sur cette Figure, sont représentées les concentrations en fonction de la durée de colonisation (jours).

NB : Pour la station TR, seule les mesures de COT et Ntotal sont présentées car le COD et Ndissous n'ont pas été déterminés dans un premier temps.

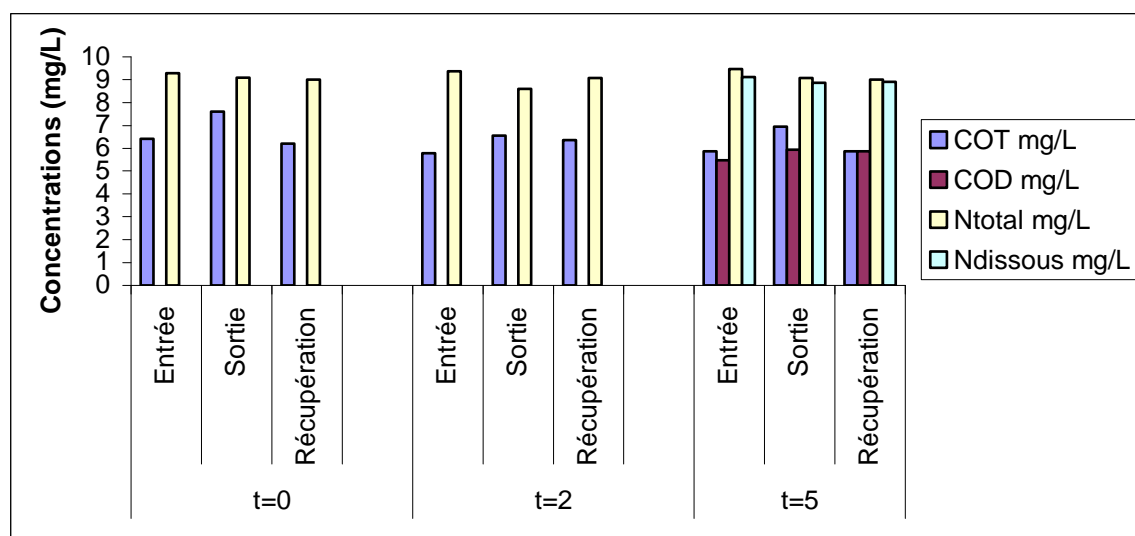


Figure 58a : Evolution des concentrations en carbone et azote au cours du temps

(l'eau alimentant le bioréacteur est issue de la station TR) avec t en jours (précision $\pm 0,2$ mg/L)

NB : à t=0 et à t=2, les valeurs de COD et d'N dissous n'ont pas été mesurées.

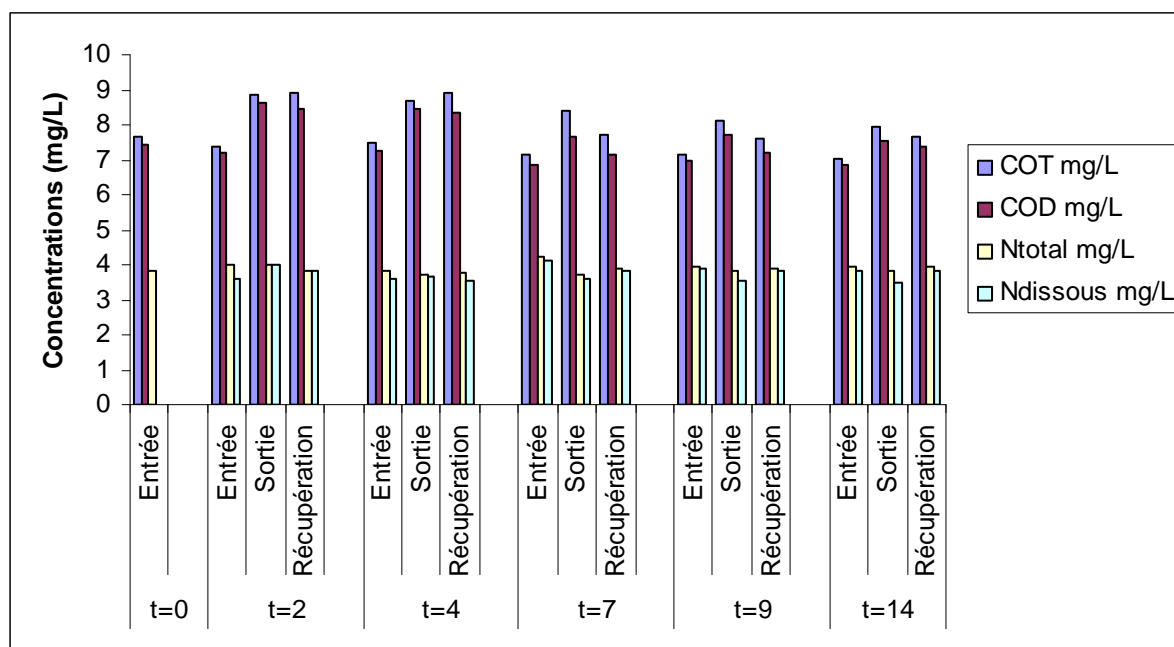


Figure 58b : Evolution des concentrations en carbone et azote au cours du temps

(l'eau alimentant le bioréacteur est issue de la station AV) avec t en jours (précision $\pm 0,2$ mg/L)

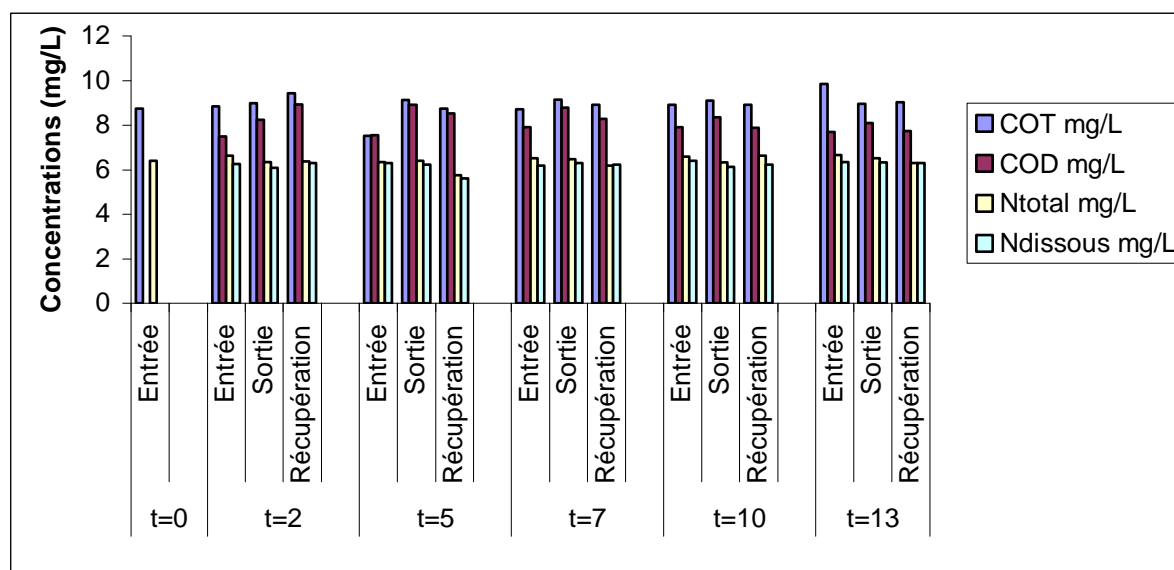


Figure 58c : Evolution des concentrations en carbone et azote au cours du temps
(l'eau alimentant le bioréacteur est issue de la station ZB) avec t en jours (précision $\pm 0,2$ mg/L)

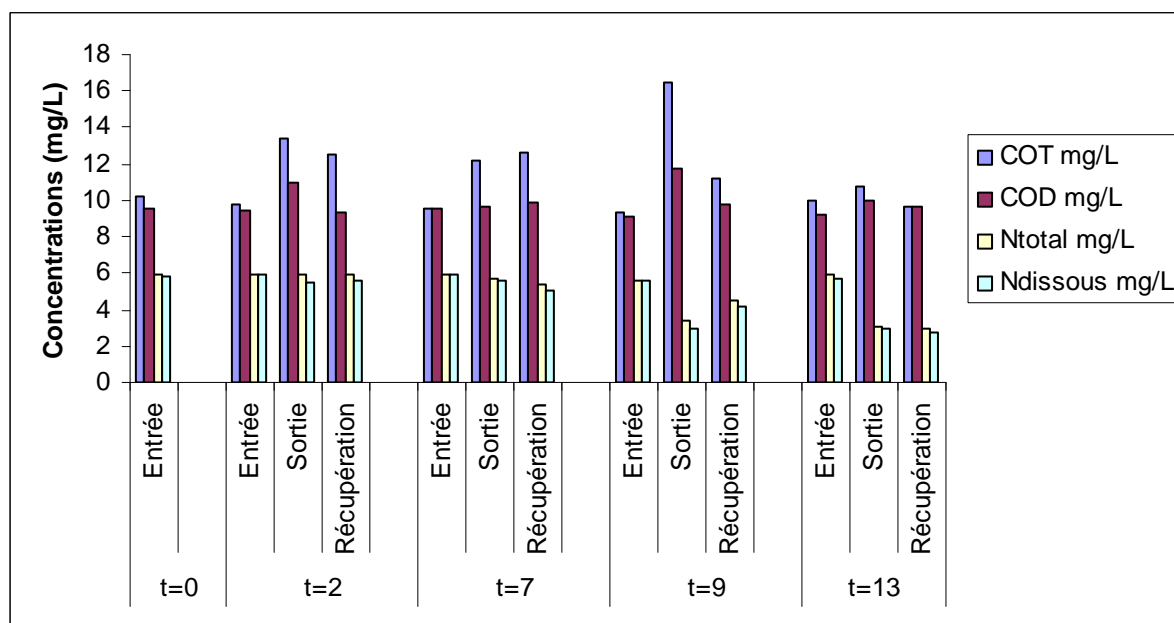


Figure 58d : Evolution des concentrations en carbone et azote au cours du temps
(L'eau alimentant le bioréacteur est issue de la station TR) avec t en jours (précision $\pm 0,2$ mg/L)

Figure 58 : Evolution des concentrations en carbone et azote au cours du temps (jours) avant et après passage dans le bioréacteur.

Comparés aux valeurs des entrées, les résultats obtenus montrent que les concentrations en COT et COD sont toujours légèrement supérieures en sortie de bioréacteur pour toutes les eaux étudiées. Cette différence de COD et COT entre entrée et sortie est variable en fonction du type d'eau et du temps de colonisation. Cet apport de carbone

organique issu du bioréacteur peut avoir plusieurs origines. Sans exclure la possibilité de relargage de carbone issu des tuyaux en polymères, d'autres voies de production de MO sont possibles comme :

- par photosynthèse (en particulier pour l'eau de la station TR (Figure 58d)).
- par le biais d'exudats de bactéries (Flemming et coll, 2007),
- par des décrochages de biofilms tels ceux observés en sortie à $t=9$ jours pour la station TR (Figure 58d, $t = 9$).

En résumé, ces résultats ont montré une tendance à une augmentation du COT et du COD après passage au sein du bioréacteur pour toutes les eaux testées. Par conséquent, dans ces conditions opératoires, le biofilm ne conduit pas à un abattement de ces deux paramètres.

La Figure 58 ne montre pas d'évolution des concentrations en azote total et dissous excepté pour l'eau de la station TR (Figure 58d) où à partir du 9ème jour, un abattement a été observé. Comme nous le verrons plus loin, le biofilm de cette eau est significativement plus épais que les autres biofilms avec la présence d'algues pour expliquer une meilleure efficacité de l'élimination de l'azote par le biais de la photosynthèse.

IV.1.2/ Fractionnement des eaux après passage sur résine XAD-8 et XAD-4.

Les variations de COD entre entrée et sortie n'ayant pas permis de tirer des conclusions claires, nous avons réalisé un fractionnement par passage sur résine XAD afin de suivre d'éventuelles transformations de la MO non visible par des mesures de COT et de COD. Pour réaliser ces expériences dans le pilote, les eaux d'alimentations et traitées par le biofilm ont été fractionnées en différentes fractions hydrophiles, hydrophobes et transphiliques. Ces dernières composent ainsi la MO des eaux de surfaces (Leenheer, 1981 ; Leenheer et Croué, 2003).

IV.1.2.1/ Proportion de COD entre les fractions hydrophobes, hydrophiles et transphiliques.

La Figure 59 représente les pourcentages de COD dans les fractions obtenues sur des eaux avant et après passage dans un bioréacteur. Pour réaliser cette étude, le biofilm développé dans le pilote se situe en phase stationnaire (après 7 jours).

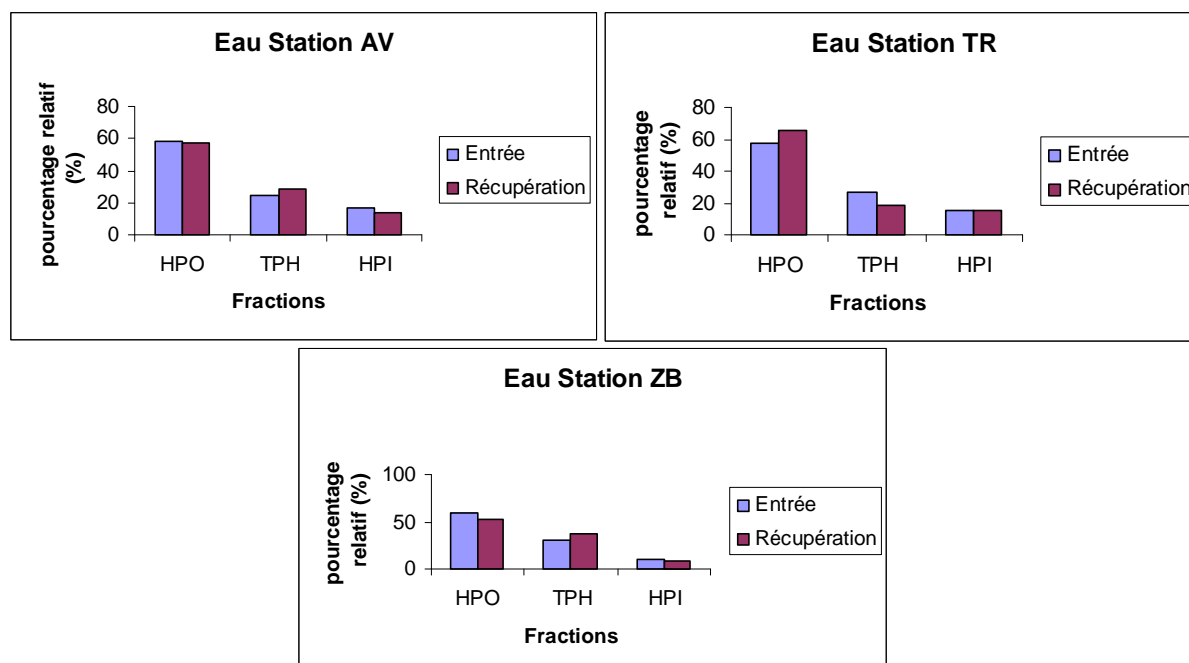


Figure 59: Fractionnement des différentes eaux avant et après passage dans un bioréacteur (+/-5 %)

La Figure 59 indique les pourcentages représentés par les différentes fractions du COD (E = Entrée pilote, R = Récupération pilote). Les fractions hydrophobes (HPO) représentent environ 60 % du COD, les substances hydrophiles (HPI) environ 15 %, enfin, les fractions transphiliques (TPH) sont intermédiaires. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus antérieurement sur le lac de Ribou (Violleau, 1999). Les pourcentages de carbone dissous entre l'entrée et la récupération ne varient que très faiblement quel que soit la fraction considérée. **Cependant, la présence de biofilms suggère qu'il y a certainement une activité microbiologique et de la transformation de la MO dans les eaux au sein même des différentes fractions.** C'est pourquoi, nous avons cherché à vérifier cela et mettre en évidence l'impact du biofilm sur la MO en utilisant des techniques plus sensibles : la fluorimétrie 3D (parlanti et coll, 2000) et la pyrolyse CG-SM (Bruchet, 1985 ; Bruchet et coll, 1990 ; Demeusy, 2007).

IV.1.3/ Evolution des fluorophores A et C puis B et T

IV.1.3.1/ Evolution des fluorophores A et C

La Figure 60 présente les résultats des intensités des fluorophores A et C correspondant à des substances humiques à $t=0$ jours (eaux d'alimentation) et à $t=13$ jours (Eaux de récupération traitées par les biofilms). Les biofilms ont été élaborés avec les eaux de stations AV, ZB et TR2. Les analyses sont réalisées sur les eaux d'alimentation fraîchement prélevées et les eaux de récupération après 13 jours de colonisation.

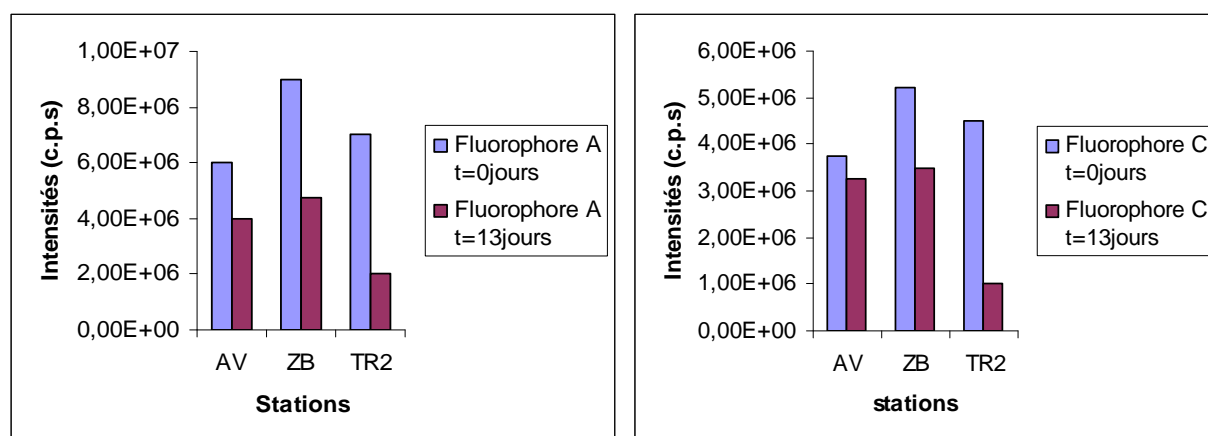


Figure 60 : Suivi des fluorophores A et C au sein d'une eau de station à $t=0$ jours et à $t=13$ jours de colonisation (précision 1%)

La Figure 60 montre que les intensités des fluorophores A sont toujours supérieures aux intensités des fluorophores C ce qui est cohérent avec la littérature (Demeusy, 2007). Nous rappelons que la nature des substances humiques est différente entre ces deux fluorophores. Pour toutes les eaux étudiées, les fluorophores A et C ont vu leurs intensités diminuées durant la colonisation des billes par les biofilms. La MO correspondant à ces fluorophores a bien été transformée après passage dans le pilote. Lors de l'étude suivante, nous avons cherché à mettre en évidence les différences de fluorescence des fluorophores B et T entre l'alimentation et la récupération. Ces fluorophores correspondent à l'activité microbienne (Parlanti et coll, 2000).

IV.1.3.2/ Evolution des fluorophores B et T

La Figure 61 présente les résultats des intensités des fluorophores B et T à t=0jours (eaux d'alimentation) et à t=13jours (Eaux de récupération traitées par les biofilms). Comme précédemment, les analyses ont été réalisées sur les eaux d'alimentation fraîchement prélevées et les eaux de récupération après 13 jours de colonisation des billes par les biofilms.

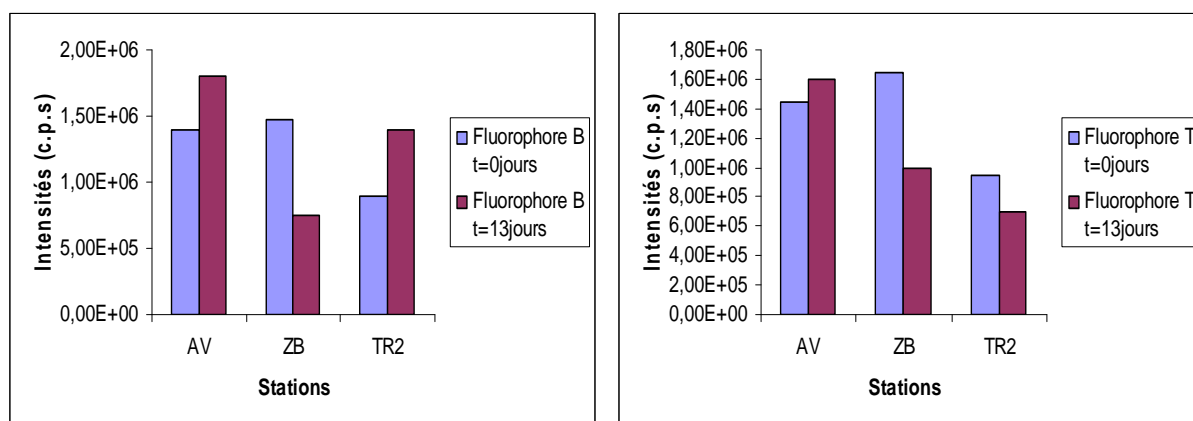


Figure 61: Suivi des fluorophores B et T au sein d'une eau de station à t=0jours (eau alimentation) et à t=13 jours de colonisation (récupération) (précision 1 %)

La Figure 61 indique que les fluorophores B pour les eaux des stations AV et TR2, ont des intensités plus importantes après le traitement par les biofilms et moins importantes pour l'eau de la station ZB. Ces résultats traduisent bien une activité microbienne (Parlanti et coll, 2000). De plus, ces fluorophores ont probablement été transformés par les microorganismes de la station ZB expliquant ainsi la diminution de leurs intensités. Les fluorophores T ont également subi des transformations dans l'eau ZB et TR2 car leur fluorescence a fortement diminué. L'augmentation des intensités de ces fluorophores dans les eaux de station AV traduit également une activité microbienne. Globalement, l'apparition ou la disparition des fluorophores B et T n'est pas simultanée et dépend des eaux et des biofilms. Comme il a été montré précédemment, le COD n'étant pas éliminé, la MO subit bien des transformations que nous allons chercher à mettre en évidence par le fractionnement des eaux pour visualiser ces mêmes fluorophores B et T.

IV.1.3.3/ Comparaison des fluorophores B et T à partir des eaux préalablement fractionnées

Les Figures 62 à 64 présentent l'évolution des intensités de fluorescence des fluorophores B et T au sein des différentes fractions (HPO, TPH et HPI) avant et après passage dans le pilote. Dans tous les cas, le fractionnement des eaux est effectué entre les eaux d'alimentation et de récupération issues de chaque station.

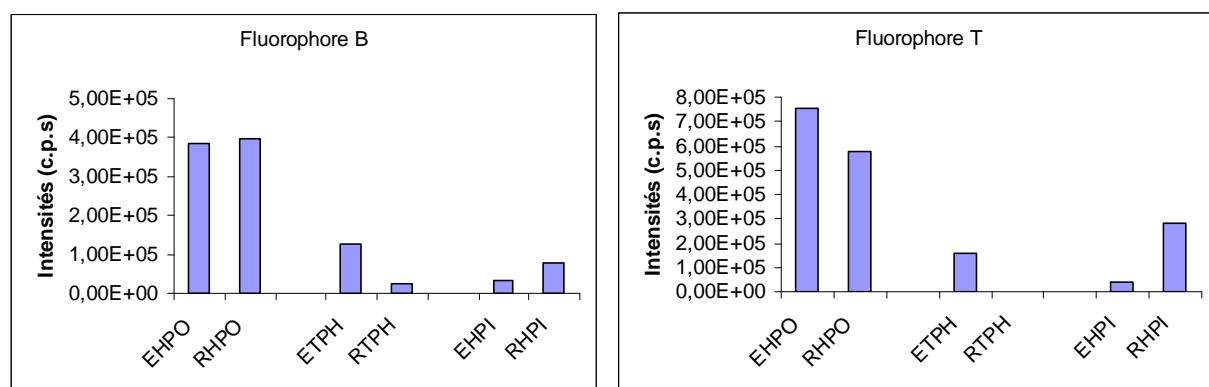


Figure 62 : Evolution des intensités de fluorescence des fluorophores B et T dans les eaux d'entrée AV fractionnées (EHPO, ETPH et EHPI) et de récupération (RHPO, RTPH et RHPI) (précision 1 %)

La Figure 62 montre que les fluorophores B n'ont pas évolué dans les fractions HPO entre l'entrée et la récupération mais sont plus importantes dans les fractions RHPI. Les fluorophores T ont également des intensités de fluorescence plus importantes dans les fractions HPI des eaux de récupération (RHPI). L'activité microbienne est plus marquée dans ces fractions RHPI. Ces fluorophores sont alors de natures hydrophiles.

La Figure 63 a montré une différence importante entre les intensités des fractions EHPO et RHPO avec une diminution des fluorophores dans les fractions R-HPO et une augmentation de ces derniers dans les fractions RHPI soulignant comme précédemment une activité biologique marquée au sein du bioréacteur surtout au niveau des fractions RHPI.

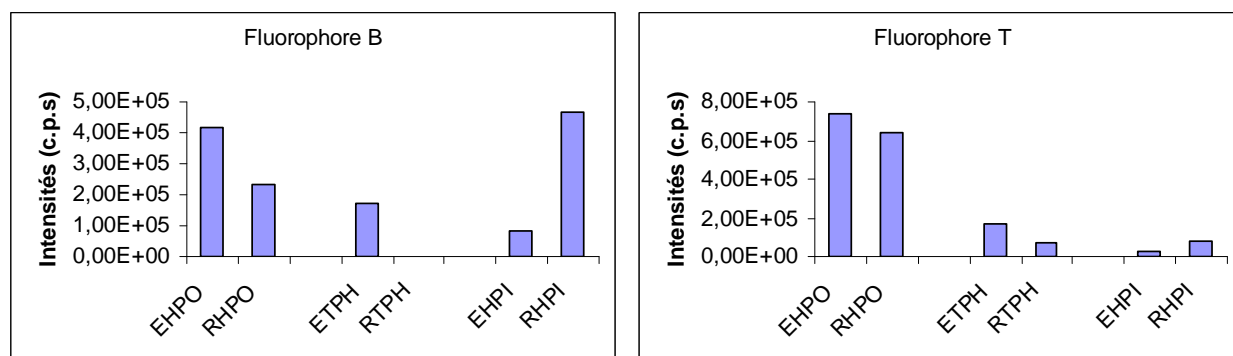


Figure 63 : Evolution des intensités de fluorescence des fluorophores B et T dans les eaux d'entrée ZB fractionnées (EHPO, ETPH et EHPI) et de récupération (RHPO, RTPH et RHPI) (précision 1 %)

La Figure 64 montre l'évolution des intensités de fluorescence des fluorophores B et T dans pour les eaux TR2 avant et après passage dans le bioréacteur.

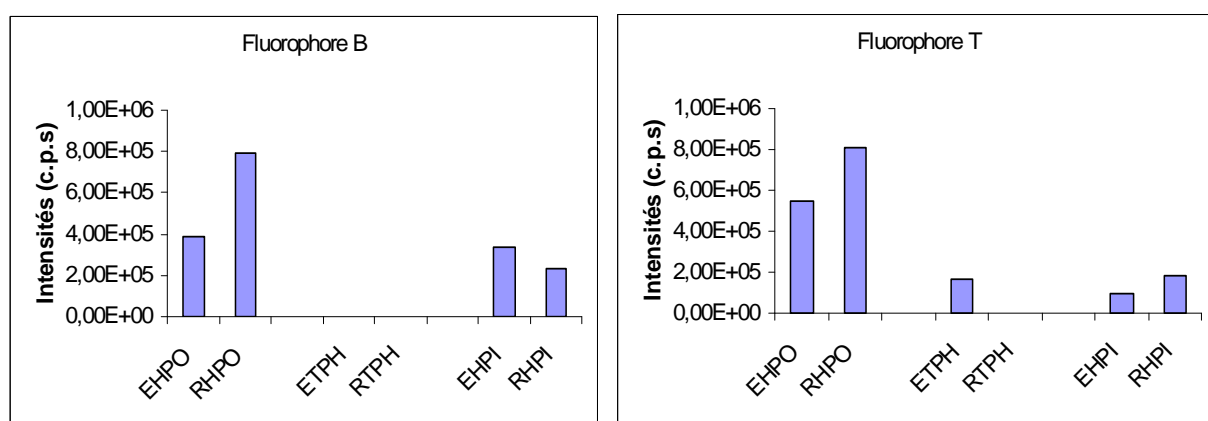
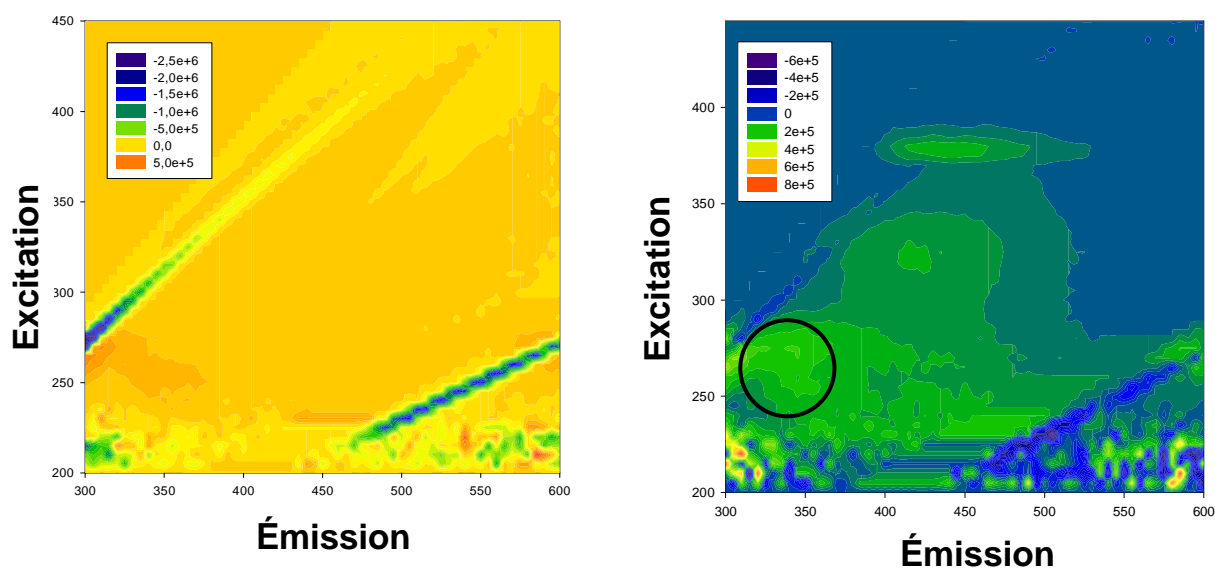


Figure 64 : Evolution des intensités de fluorescence des fluorophores B et T dans les eaux fractionnées TR2 d'entrée (EHPO, ETPH et EHPI) et de récupération (RHPO, RTPH et RHPI) (précision 1 %)

La Figure 64 indique une nette augmentation des intensités des fluorophores B et T, après passage dans le bioréacteur, contenues dans les fractions RHPO. Les fluorophores T et B sont plutôt de natures hydrophobes. Il semblerait que l'activité microbiologique dans les fractions hydrophobes soit plus importante dans les stations anthropisées (Demeusy, 2007). Ces résultats semblent souligner que la présence de certains polluants apportés dans le milieu soit favorable à la dégradation des substances hydrophobes faisant intervenir un cométabolisme (Labanowski, 2004).

Afin d'illustrer ces résultats, la Figure 65 présente les fractions hydrophiles d'entrée et issues du réservoir de récupération.



a/ Fraction hydrophile d'eau d'alimentation

b/ Fraction hydrophile d'eau de récupération

Figure 65 : Spectres de fluorescence des fractions HPI d'entrée et de récupération après 10 jours de colonisation sur billes de verres au sein du bioréacteur

Ces résultats témoignent que la zone correspondant au fluorophore T a une fluorescence supérieure dans l'eau issue du réservoir de récupération (zone entourée en blanc). De plus, sur les fractions HPI de l'eau obtenue après passage au sein du bioréacteur, le fluorophore C apparaît (zone entourée en noir) ce qui montre que les molécules sont plus hydrophiles par rapport à celles contenues dans l'eau d'alimentation.

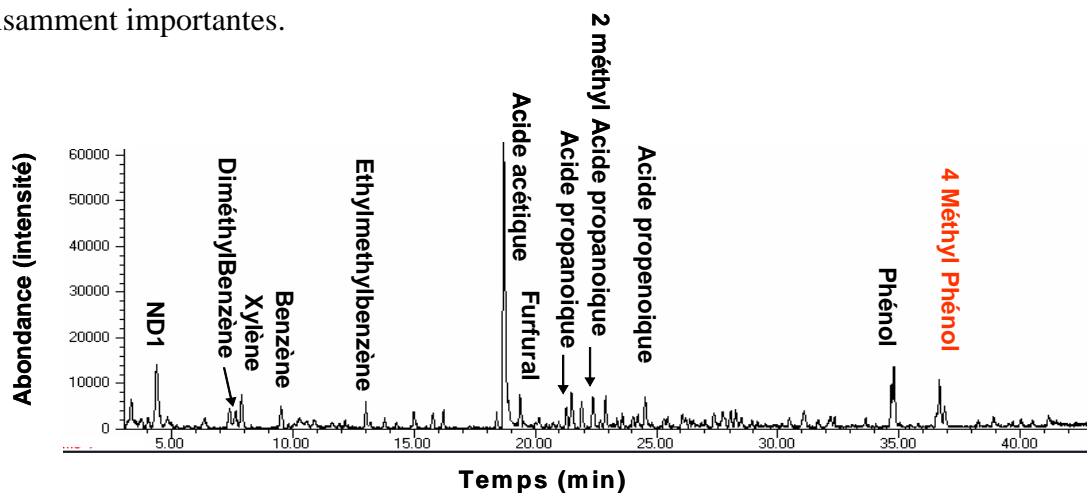
Ces résultats ont montré que le fractionnement des eaux est alors très pertinent pour mieux visualiser les fluorophores B et T car ces derniers apparaissent aussi très présents dans les fractions RHPI et les fractions RHPO.

L'évolution des fluorophores B et T dans les eaux fractionnées a permis de mettre en évidence une activité biologique. Afin de caractériser le type de la MO issue de sa transformation par le biofilm, un fractionnement des eaux d'alimentation et de récupération a été nécessaire afin d'analyser directement les fractions HPO et TPH par pyrolyse CG-SM. L'étude est réalisée sur l'eau prélevée au niveau de la station AV. Nous rappelons que 40 L d'eaux d'entrée et 40L d'eaux traitées au niveau du pilote, sont passées sur résine XAD pour obtenir les fractions HPO et TPH.

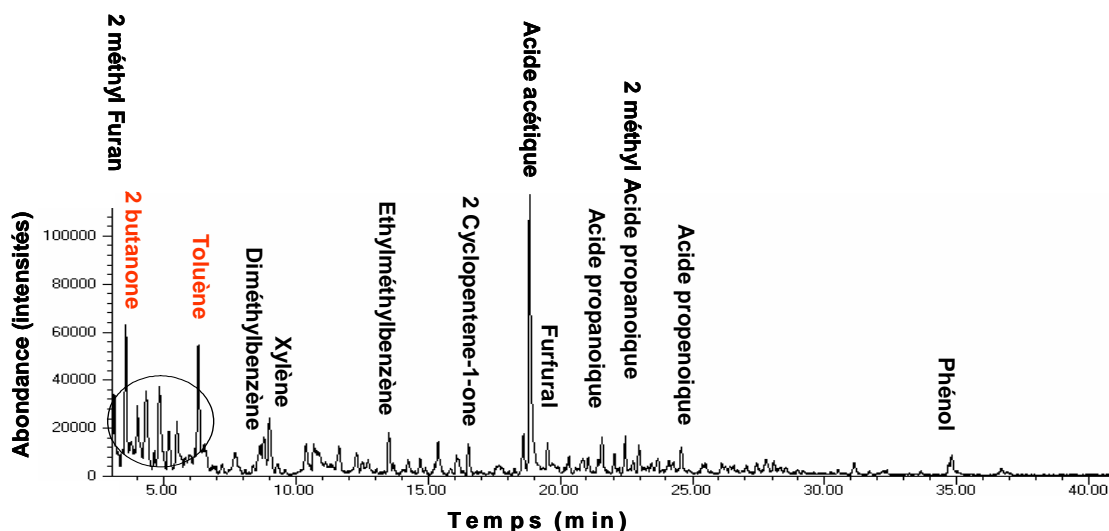
IV.1.4/ Etude des extraits de MO lyophilisés (fractions HPO et TPH) par pyrolyse CG-SM

IV.1.4.1/ Comparaison des fractions HPO d'entrée et de récupération

La Figure 66 représente les pyrochromatogrammes des fractions HPO issues des eaux d'entrée (a) et de récupération (b). Les pics représentent des sous-produits de pyrolyse. Sur ces deux chromatogrammes, les pics identifiés par un code de couleur ont des présences suffisamment importantes.



a/ Fraction HPO entrée



b/ Fraction HPO récupération

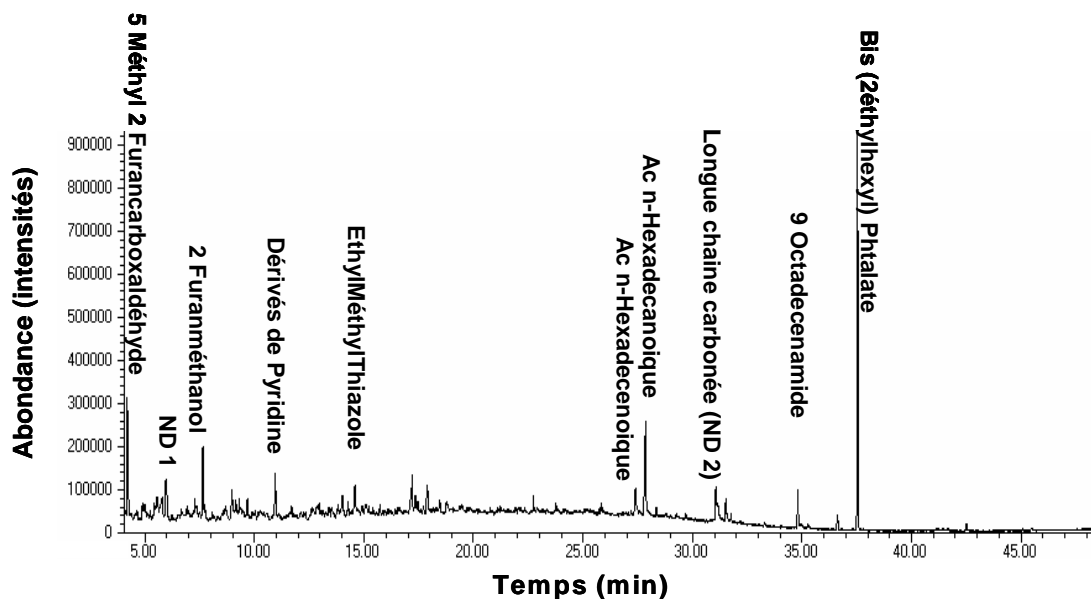
Figure 66 : Pyrochromatogrammes des fractions HPO issues des eaux d'entrée et de récupération (eau de station AV)

La Figure 66 montre que les fractions HPO sont riches en composés aromatiques (phénol, benzène) comme il est retrouvé dans la littérature (Demeusy, 2007). Des différences notables sont observées entre les fractions HPO d'entrée et de récupération et sont liées à l'activité biologique au sein du biofilm. L'apparition de plusieurs pics à des temps inférieurs à

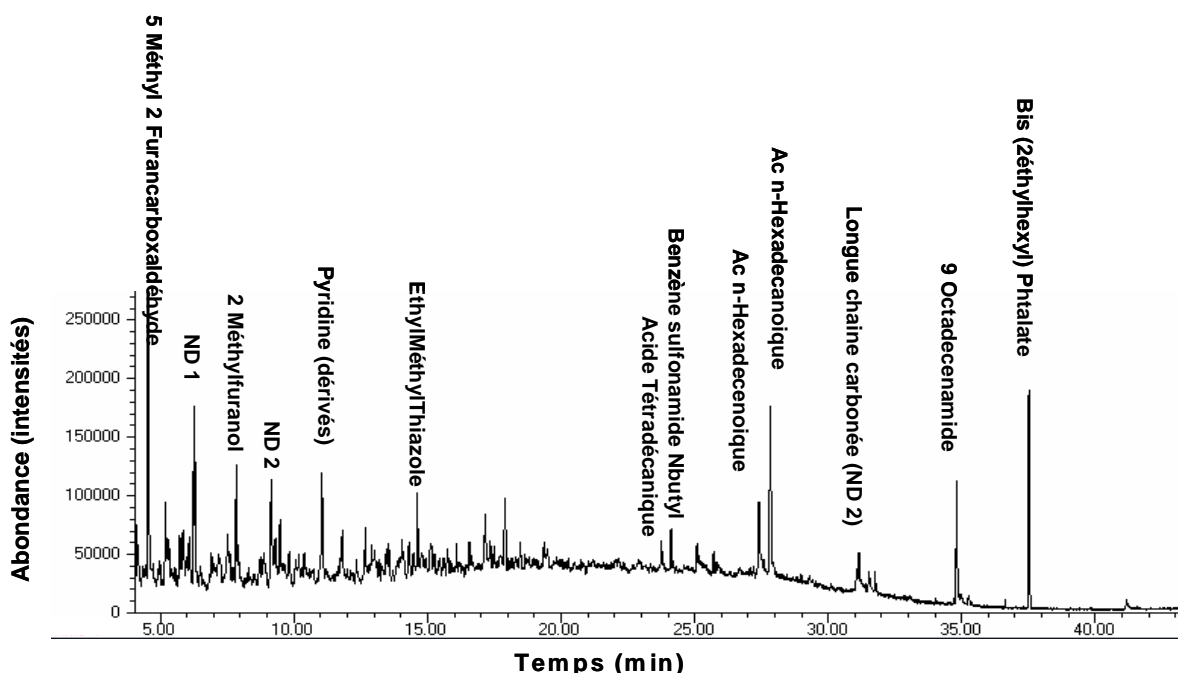
10 min montre bien que les fractions HPO ont été modifiées par le biofilm. En effet, les fragments 2-butanone et le toluène présents dans les fractions HPO issues des eaux de récupération, sont caractéristiques d'une activité biologique au sein du bioréacteur (Demeusy, 2007). L'apparition de fragments inconnus (Figure 66, cercle) sur la MO traitée par le biofilm est également visible et montre aussi l'activité microbiologique. Inversement, le 4-méthylphénol a disparu des eaux d'entrées. Sur les pyrochromatogrammes, des fragments correspondant à des composés acides sont également générés ainsi que le furfural qui est un produit de dégradation des polysaccharides. Les composés phénoliques sont certainement issus des polyphénols contenus au sein des substances humiques.

IV.1.4.2 / Les fractions TPH en entrée et récupération

La Figure 67 présente des Pyrochromatogrammes des fractions TPH issues des eaux d'entrée et de récupération.



a/ Fraction TPH entrée



b/ Fraction TPH récupération

Figure 67 : Pyrochromatogrammes des fractions TPH issues des eaux d'entrée et de récupération (eau de station AV)

Les sous-produits de pyrolyse des fractions TPH sont issus de la dégradation des sucres (5-méthyl 2 Furancarboxaldéhyde), de protéines (pyridine, dérivés de pyridine), de lipides Ac-hexadecanoïque, Ac hexadecenoïque). Après passage au sein d'un bioréacteur, des pics correspondant à des sous-produits de polysaccharides apparaissent. Ces résultats montrent bien que les activités microbiennes ont conduit à la production de ces polymères de glucides présents dans les fractions TPH.

IV.1.4.3/ Etude semi-quantitative entre certains fragments de pyrolyse caractéristique des fractions HPO et TPH

Le tableau 19 montre l'abondance relative des produits de dégradation de pyrolyse entre les fractions d'entrée et de récupération. Ces résultats ont été déterminés à partir du calcul des aires de chaque pic, sachant que l'aire est proportionnelle à la concentration des éléments présents dans l'échantillon. Comme les concentrations des éléments ne sont pas connues, une étude semi-quantitative entre certains composés de pyrolyse (%) a été effectuée.

Tableau 19 : Abondance relative des produits de dégradation de pyrolyse entre les fractions d'entrée (E) et de récupération (R) (HPO et TPH) (précision 2 %)

| Principaux Pics (%) | HPO entrée (%) | HPO sortie (%) |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Xylène</i> | 7,96 | 0 |
| <i>Ac acétique</i> | 62,45 | 67,13 |
| <i>Furfural</i> | 5,44 | 4,62 |
| <i>Ac propanoïque</i> | 6,99 | 2,77 |
| <i>4-méthylphénol</i> | 6,83 | 0 |
| <i>Phénol</i> | 10,3 | 3,21 |
| <i>2-butanone</i> | 0 | 22,24 |

| Main Peaks | TPH entrée (%) | TPH sortie (%) |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>5 méthylfurancarboxaldéhyde</i> | 40,62 | 29,10 |
| <i>Ac Hexadecenoïque</i> | 42,5 | 22,75 |
| <i>9 octadecenamide</i> | 13,35 | 14,21 |
| <i>Pics 2 (9,15 min)</i> | 3,49 | 14,85 |
| <i>Pics 1 (6,28 min)</i> | 0 | 19,06 |

L'apparition de certains fragments de pyrolyse dans les fractions HPOs : le 2-butanone montre qu'une activité biologique a permis la transformation des HPOs. Certains pics de pyrolyse notamment ceux correspondant au xylène et au 4-méthylphénol ne sont plus visibles dans les fractions HPOs. Cela montre ainsi que la MO qui permet de générer ces produits de pyrolyse a été transformée lors du passage de l'eau dans le bioréacteur. Au niveau des fractions TPHs, quelques fragments (ND 1 et 2) apparaissent au sein des fractions de MO obtenus à partir des eaux de récupération. Ces derniers, non déterminés, montrent bien que la MO a été transformée après passage dans le bioréacteur. La MO a bien subi des modifications aussi bien au sein des fractions HPO qu'au sein des fractions TPH.

Conclusion partielle

L'ensemble des résultats obtenus sur la MO a montré que le COT et le COD sont toujours légèrement supérieurs à ceux d'entrées correspondants. Cela peut être lié à une production interne de carbone par des activités bactériennes ou algales au sein du réacteur. Les variations de COT peuvent également trouver une explication par les processus de décrochage des biofilms.

La fluorimétrie 3D réalisée sur les eaux fractionnées a mis en évidence une réduction des fluorophores A et C.

La comparaison des pyrochromatogrammes des fractions HPO et TPH obtenues en entrée et en sortie de réacteur a permis de montrer également l'impact de l'activité microbologique par apparition ou disparition de sous produits de pyrolyse tels la 2-butanone et le 4-méthylphénol. Cette observation confirme certaines observations de la littérature (Bruchet, 1985 ; Demeusey, 2007).

IV.1.5/ Suivis des éléments majeurs et mineurs par ICP-OEP

Par la suite, l'étude a porté sur la problématique « excès de phosphore » c'est la raison pour laquelle, un suivi des concentrations de P total dans l'eau a été réalisé en parallèle avec le suivi du COT et du COD. Lors de l'étude et pour une meilleure visibilité, nous avons retenu le point t=0jours de l'eau d'alimentation et le point à t=10jours.

IV.1.5.1/ Dosage du phosphore total par ICP-OES

La Figure 68 indique les concentrations en P à t=0jours (Eau d'alimentation du bioréacteur) et à t=10jours (après passage dans le bioréacteur) pour les 4 stations considérées TR, AV, ZB, TR2.

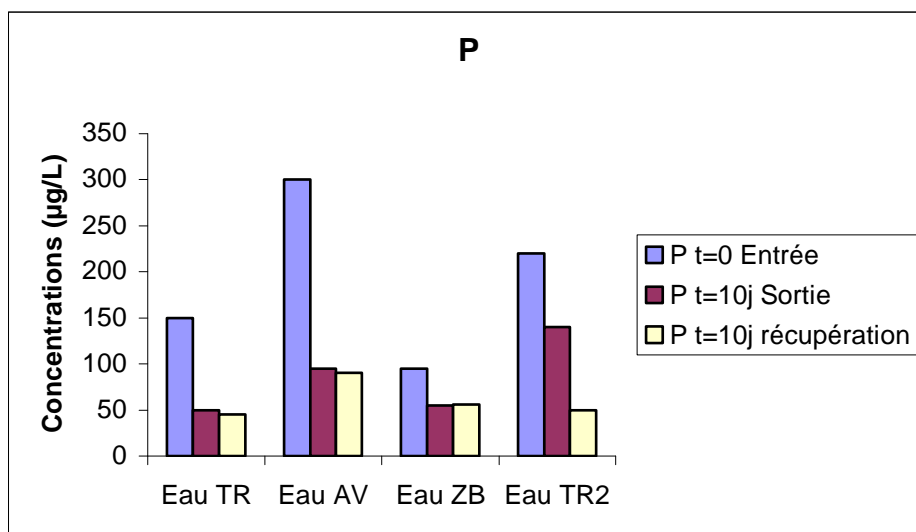


Figure 68 : Evolution des concentrations en Phosphore avant et après passage dans le bioréacteur (t=10jours) à partir des eaux prélevées à différentes stations (Précision : +/- 5 µg/L).

La Figure 68 montre l'évolution des concentrations de P avant et après le bioréacteur à biofilm à partir des eaux prélevées sur les différentes stations. Pour toutes les eaux testées, un

abattement des concentrations en phosphore est significativement observé à $t=10$ jours. Pour une même durée de colonisation, le P n'est pas incorporé de manière similaire.

En effet, les concentrations en P des eaux de la station AV passent de 300 à 100 $\mu\text{g/L}$, et les eaux issues de la station TR2 ont des concentrations qui passent de 220 à 140 $\mu\text{g/L}$. De plus, nous pouvons noter une diminution du P dans la récupération qui est peut être liée à la formation de biofilm sur les parois du réservoir et/ou à des processus de précipitation, voire à une moins bonne assimilation du phosphore par le biofilm du pilote.

En résumé, les biofilms incorporent bien le P qui constituent un élément nutritif important pour les bactéries, les algues et les diatomées et semble dépendre des caractéristiques des eaux (formes chimiques du P, concentrations).

IV.1.5.2/ Suivis des éléments majeurs

Comme pour le P, la Figure 69 indique les concentrations en Ca, K, Na, Si et Mg à $t=0$ jours (eau d'alimentation du bioréacteur) et à $t=10$ jours (après passage dans le bioréacteur) pour les 4 stations considérées TR, AV, ZB, TR2.

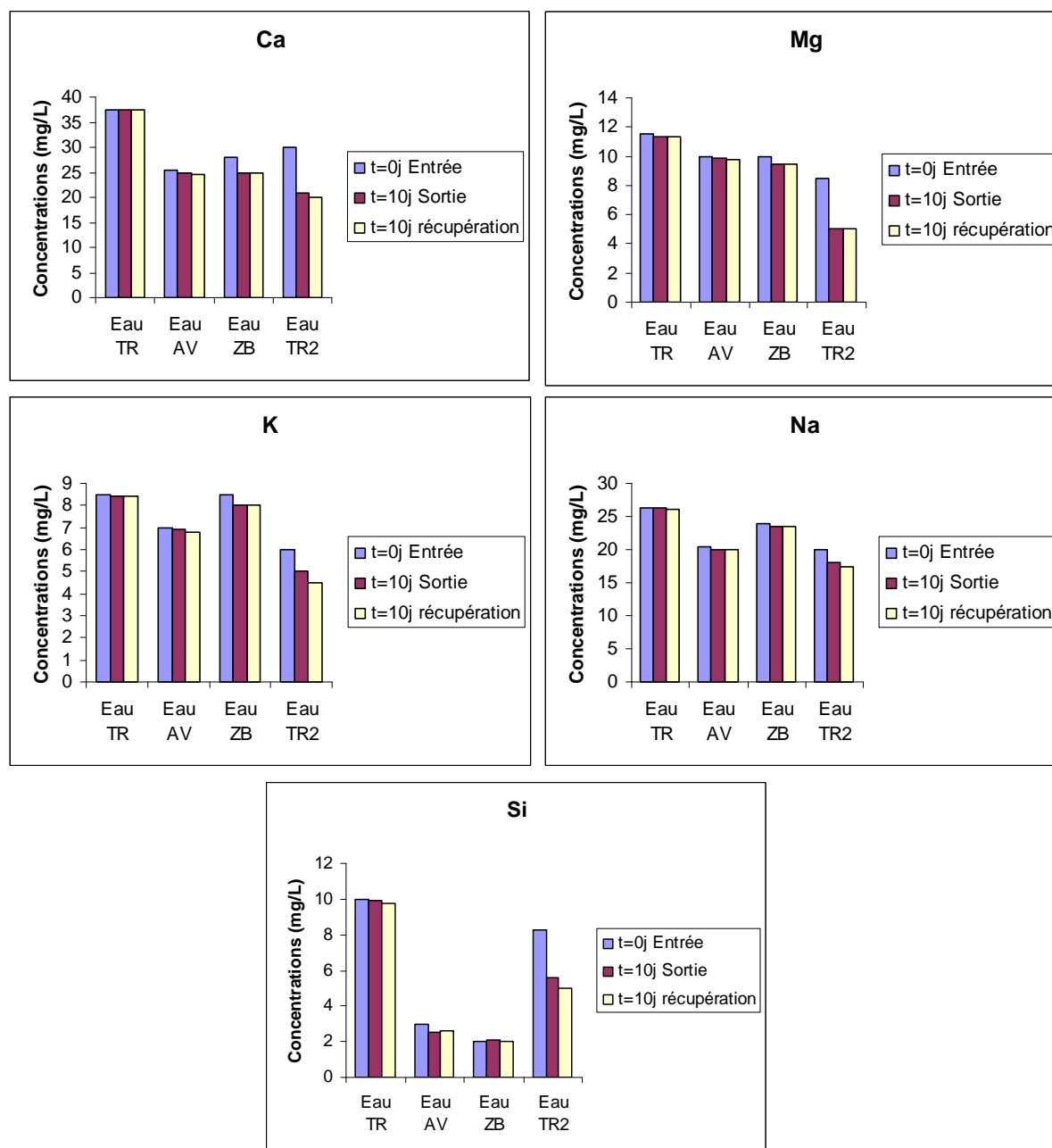


Figure 69 : Evolution des concentrations de Na, Ca, K, Mg et Si à t=0jours (alimentation) et à t=10jours (sortie, récupération) pour les eaux des différentes stations (précision : +/- 0,5 mg/L)

Globalement, les différences de concentrations en Na, Ca, K, Mg, Si entre l'alimentation à t=0jours et la sortie/récupération à t=10jours ne sont pas très marquées avec ces éléments. Ces derniers sont peu incorporés dans les biofilms et n'engendrent pas de grandes variations de concentrations dans les eaux. Un abattement de ces éléments dans les eaux est cependant plus marqué dans les eaux de la station TR2 ce qui laisse supposer que le biofilm constitué avec cette eau est plus favorable à leurs incorporations que les autres biofilms.

IV.1.5.3/ Suivi des éléments mineurs au sein de l'eau

Le biofilm incorpore assez facilement des éléments mineurs comme le Zn, le Mn, le Fer, l'Al au sein des biofilms (Parinet, 2005 ; Hiernaux, 2005). L'étude a alors porté sur le suivi de ces éléments dans les différentes eaux à t=0 jours (alimentation) et à t=10jours (sortie et récupération)

La Figure 70 montre l'évolution des concentrations en Zn, Fe, Mn et Al avant et après le bioréacteur à biofilm à partir des eaux prélevées à différentes stations.

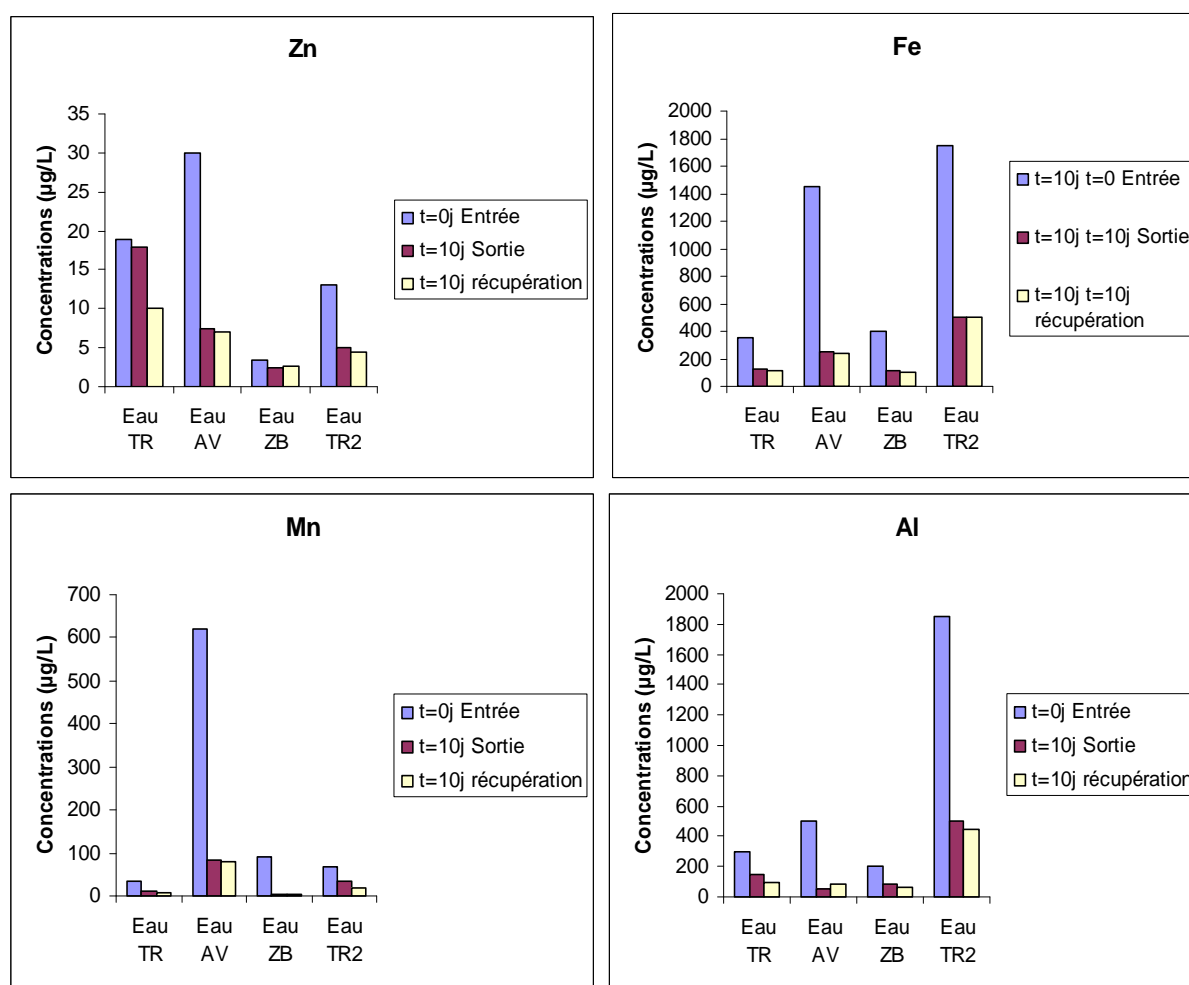


Figure 70 : Evolution des concentrations de Mn, Al, Fe et Zn à t=0jours (alimentation) et à t=10jours (sortie, récupération) dans les eaux des différentes stations (précision : +/- 5 µg/L).

Pour toutes les eaux étudiées, les concentrations de chacun de ces éléments ont significativement diminuées. A t=10jours, il est à noter que cette diminution est différente selon les stations étudiées et que les métaux ne sont pas incorporés de manière identique dans

les biofilms. En 2007, Miyata *et coll*, a stipulé que l'incorporation des métaux dans les biofilms dépendait de leurs concentrations dans les eaux, de leurs spéciations et par conséquent de la composition physico-chimique des eaux.

IV.1.6/ Suivis du pH, de la conductivité, température et turbidité dans les eaux avant et après traitement dans le bioréacteur.

Le tableau 20 indique les valeurs moyennes de 4 paramètres physico-chimiques mesurés en entrée, en sortie et récupération de bioréacteur (pH, Conductivité, Température, Turbidité).

Tableau 20: Valeurs moyennes de 4 paramètres physico-chimiques : pH, Conductivité, Température et Turbidité pour les stations TR à deux périodes, AV et ZB

| Eaux | | Valeurs moyennes (sur 3 ou 4 valeurs) | | | |
|------|--------------|---------------------------------------|----------------------|------------------|-----------------|
| | | pH | Conductivité (µS/cm) | Température (°C) | Turbidité (NTU) |
| TR | Entrée | 7,42 | 364 | 16,9 | 2,6 |
| | Sortie | 7,19 | 358 | 19,8 | 2,1 |
| | récupération | 7,27 | 363 | 18,7 | 1,8 |
| AV | Entrée | 6,95 | 328 | 18,1 | 20,5 |
| | Sortie | 6,89 | 325 | 19,7 | 3,9 |
| | récupération | 7,06 | 332 | 18,8 | 3,5 |
| ZB | Entrée | 7,14 | 309 | 18,8 | 4,1 |
| | Sortie | 7,13 | 310 | 20,3 | 3,3 |
| | récupération | 7,16 | 309 | 19,3 | 2,2 |
| TR2 | Entrée | 7,45 | 292 | 16,2 | 17,3 |
| | Sortie | 7,3 | 295 | 17,5 | 13,6 |
| | récupération | 7,3 | 290 | 16,8 | 9,5 |

Précision pH : +/- 0,1 unité pH ; Conductivité : +/- 2 µS/cm ; Température : +/- 0,1°C ; Turbidité : +/- 1 NTU

Les résultats montrent que les variations de pH entre les entrées, sorties et récupérations sont très faibles ce qui signifie que le pH est plutôt stable au cours du temps, au même titre que la conductivité. En revanche, les valeurs de température augmentent légèrement après passage au sein du bioréacteur (sortie située hors de la pièce chauffée) car l'eau se réchauffe dans le bioréacteur placé dans la pièce chaude (30°C). La turbidité est diminuée après passage dans le bioréacteur. L'eau AV utilisée pour élaborer le biofilm AV est très riche en MES mis en évidence par une forte turbidité moyenne au sein des eaux d'entrées (20,5 NTU) alors qu'en sortie, ce paramètre a été divisé par 5. Les eaux en sortie du bioréacteur ont été clarifiées.

Conclusion Partielle

Ces travaux ont montré que l'élaboration du biofilm n'engendrait pas d'élimination du COT et du COD dans nos conditions opératoires. Cependant, le fractionnement des eaux, la fluorimétrie 3D et la pyrolyse CG-SM ont mis en évidence une transformation de la MO pour toutes les eaux testées.

L'étude de l'évolution des concentrations en éléments chimiques des eaux brutes traitées par les biofilms a montré que les éléments majeurs (Na, Mg, Ca) étaient faiblement éliminés dans les eaux alors que le P et les éléments mineurs (Al, Fe, Mn) le sont fortement. De plus, pour toutes les eaux testées, une diminution de la turbidité a été observée après passage dans le pilote.

Nous avons ensuite effectué un suivi des paramètres microbiologiques dans les eaux et dans des conditions contrôlées car ces dernières contribuent fortement à la formation du biofilm. La composition des biofilms dépend des espèces biologiques présentes dans les eaux.

IV.2/ SUIVIS DES PARAMETRES MICROBIOLOGIQUES DANS LES EAUX

IV.2.1/ Dénombrement d'algues, de diatomées et de cyanobactéries

La Figure 71 représente l'abondance relative entre diatomées, algues et cyanobactéries (%) au niveau de l'eau d'alimentation issue de la station TR2 (notée E), de l'eau de récupération (notée R) et au sein du biofilm, en fonction du temps. Les eaux utilisées (entrée) dans l'élaboration du biofilm TR2 sont issues d'une station qui est très anthropisée avec une concentration en COT proche de 10 mg/L, en azote total, proche de 6 mg/L et des concentrations en P total comprises entre 0,1 et 0,2 mg/L.

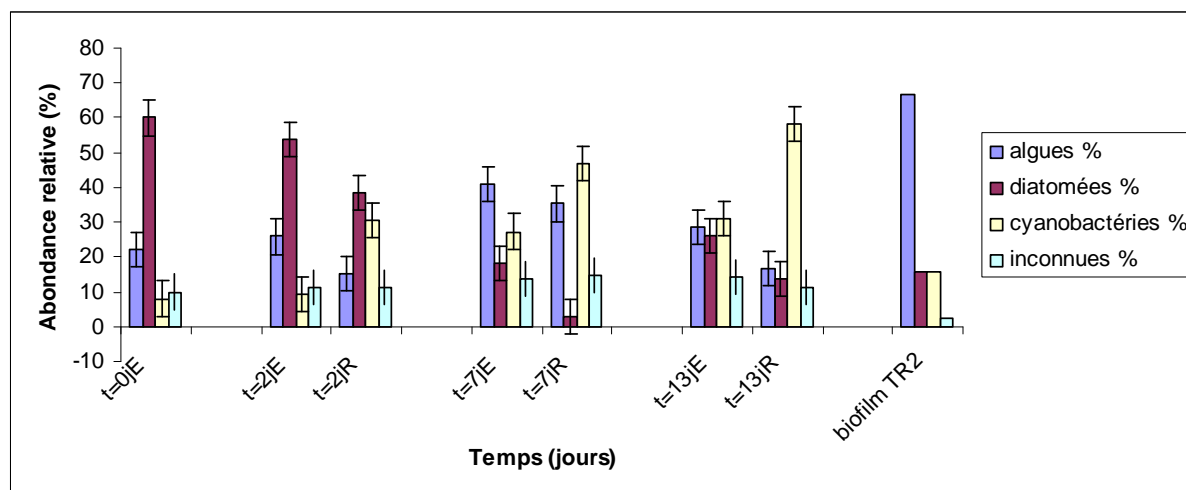


Figure 71 : Abondance relative entre les différentes espèces présentes avant et après passage dans le bioréacteur et au sein du biofilm TR2 correspondant (E : entrée, R : récupération)

La Figure 71 montre que l'eau à $t = 0$ jours contient majoritairement des diatomées (environ 60 %) et minoritairement des algues (20 %) et des cyanobactéries (< 10 %). Cependant, l'eau d'alimentation évolue au cours du temps. C'est pourquoi, à chaque prélèvement, il est nécessaire de suivre simultanément la composition de l'eau d'entrée et de récupération. Les résultats obtenus montrent que les conditions au sein du bioréacteur sont favorables aux cyanobactéries car ces dernières représentent un pourcentage très élevé dans les eaux de récupération. En effet, pour le jour 13, les cyanobactéries représentent près de 60 % de l'ensemble du « phytoplancton ». Cependant, au cours du temps, le pourcentage de cyanobactéries augmente aussi dans les eaux d'entrée mais reste plus élevé dans les eaux de récupération. Le biofilm TR2 contient très majoritairement des algues (> 60 %) alors que les diatomées et les cyanobactéries représentent un plus faible pourcentage (< 20 %). Ces

résultats montrent que les algues auraient une meilleure affinité à se fixer au support et éventuellement à se multiplier, alors que les cyanobactéries sont retrouvées en suspension dans l'eau du fait des conditions physico-chimiques qui leur sont favorables. Des observations antérieures (De Nardi, 2007) ont montré que pendant les périodes de blooms de cyanobactéries dans le lac de Ribou, c'est-à-dire lorsqu'elles sont majoritaires en suspension, elles sont minoritaires dans le biofilm. Les résultats observés corroborent ainsi les données obtenues en 2007. Nous nous sommes alors intéressés aux biofilms élaborés à partir d'eaux issues de stations différentes.

La Figure 72 représente l'abondance relative entre diatomées, algues et cyanobactéries (%) au niveau de l'eau d'alimentation prélevée au niveau de la **zone de baignade** (notée E), de l'eau de récupération (notée R) et au sein du biofilm, en fonction du temps.

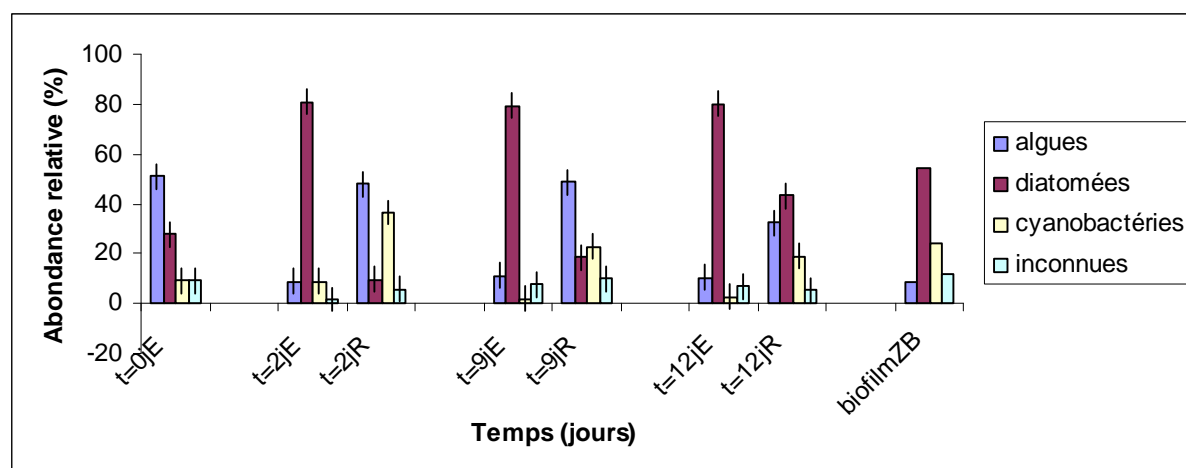


Figure 72: Abondance relative entre les différentes espèces présentes avant et après passage dans le bioréacteur et au sein du biofilm ZB correspondant (E : entrée, R : récupération)

La Figure 72 montre que l'eau à t = 0 jours (0j) contient majoritairement des algues (environ 50 %) suivi des diatomées (environ 30 %) et des cyanobactéries (environ 10 %). Après avoir stocké l'eau à 4°C et à l'obscurité, les diatomées deviennent prépondérantes (t = 2jE, 9jE, 12jE) dans les eaux d'alimentation alors que les algues sont majoritaires dans les eaux de récupération (40 à 50 %) avec un pourcentage de cyanobactéries également plus important qui est compris en moyenne entre 20 et 40 %. Comme précédemment, les pourcentages relatifs des algues et des cyanobactéries sont plus importants dans l'eau de récupération à l'exception du jour 12 où les diatomées redeviennent majoritaires (40 – 50 %). Au sein du biofilm, ces dernières représentent près de 60 %. Ces résultats révèlent que les diatomées auraient plus

d'affinités à se fixer et aussi à se multiplier au sein du biofilm dans nos conditions opératoires.

La Figure 73 représente l'abondance relative entre diatomées, algues et cyanobactéries (%) au niveau de l'eau d'alimentation prélevée au niveau de la station AV (notée E), de l'eau de récupération (notée R) et au sein du biofilm, en fonction du temps.

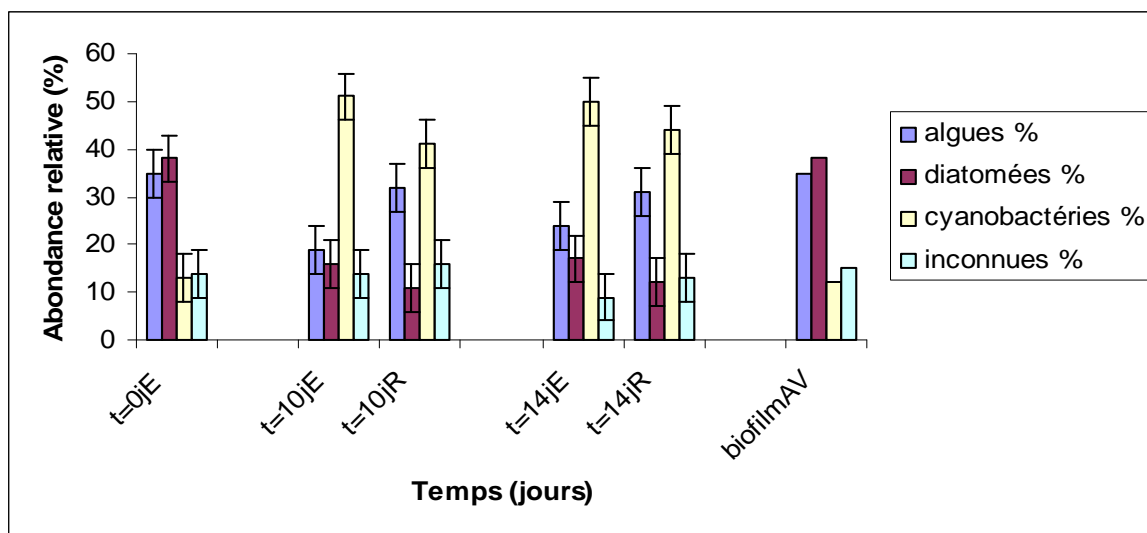


Figure 73 : Abondance relative entre les différentes espèces présentes avant et après passage dans le bioréacteur et au sein du biofilm AV correspondant (E : entrée, R : récupération)

La Figure 73 montre que l'eau à $t = 0jE$ contient les mêmes proportions d'algues et de diatomées (environ 30-40 %) et des cyanobactéries (environ 10 %). Comme précédemment, une modification des proportions entre ces microorganismes dans les eaux d'entrée est notable. Cela est marqué surtout par de fortes proportions de cyanobactéries pouvant dépasser les 50 %. Dans les eaux de récupération, les algues représentent environ 30 % alors que dans les eaux d'entrée, elles ne représentent qu'environ 20 %. Cependant, les cyanobactéries restent majoritaires dans l'eau de récupération (environ 40 %). Le biofilm est composé de diatomées et d'algues dans les mêmes proportions (30 – 40 %) et de cyanobactéries (environ 10 %).

Dans les 3 cas, l'étude a montré qu'après passage dans le bioréacteur, les proportions d'algues et de cyanobactéries augmentaient. L'eau passe d'une température ambiante (environ 20 °C) à 30 °C favorable aux développements des cyanobactéries et des algues. L'évolution des proportions entre ces communautés au cours du temps dépend des eaux étudiées. De plus, tous les biofilms sont différents d'un point de vue des proportions entre les algues, les diatomées et les cyanobactéries ce qui montre bien qu'ils dépendent initialement de la

composition de l'eau et par conséquent des espèces présentes dans les eaux. Cependant, même si les cyanobactéries sont souvent prépondérantes dans l'eau par rapport aux autres taxons, elles ne représentent que 10 à 30 % au sein d'un biofilm issu d'un réacteur à billes de verre. Ces résultats sont du même ordre de grandeur par rapport à un biofilm épiphytique (De Nardi, 2007).

IV.2.2/ Détermination de la population totale bactérienne

Les bactéries étant les premiers microorganismes qui adhèrent à un support, il semble alors pertinent de suivre l'évolution de leurs concentrations dans l'eau car ce paramètre doit intervenir dans la formation du biofilm.

La Figure 74 indique la population bactérienne totale avant et après passage au sein d'un bioréacteur au cours du temps.

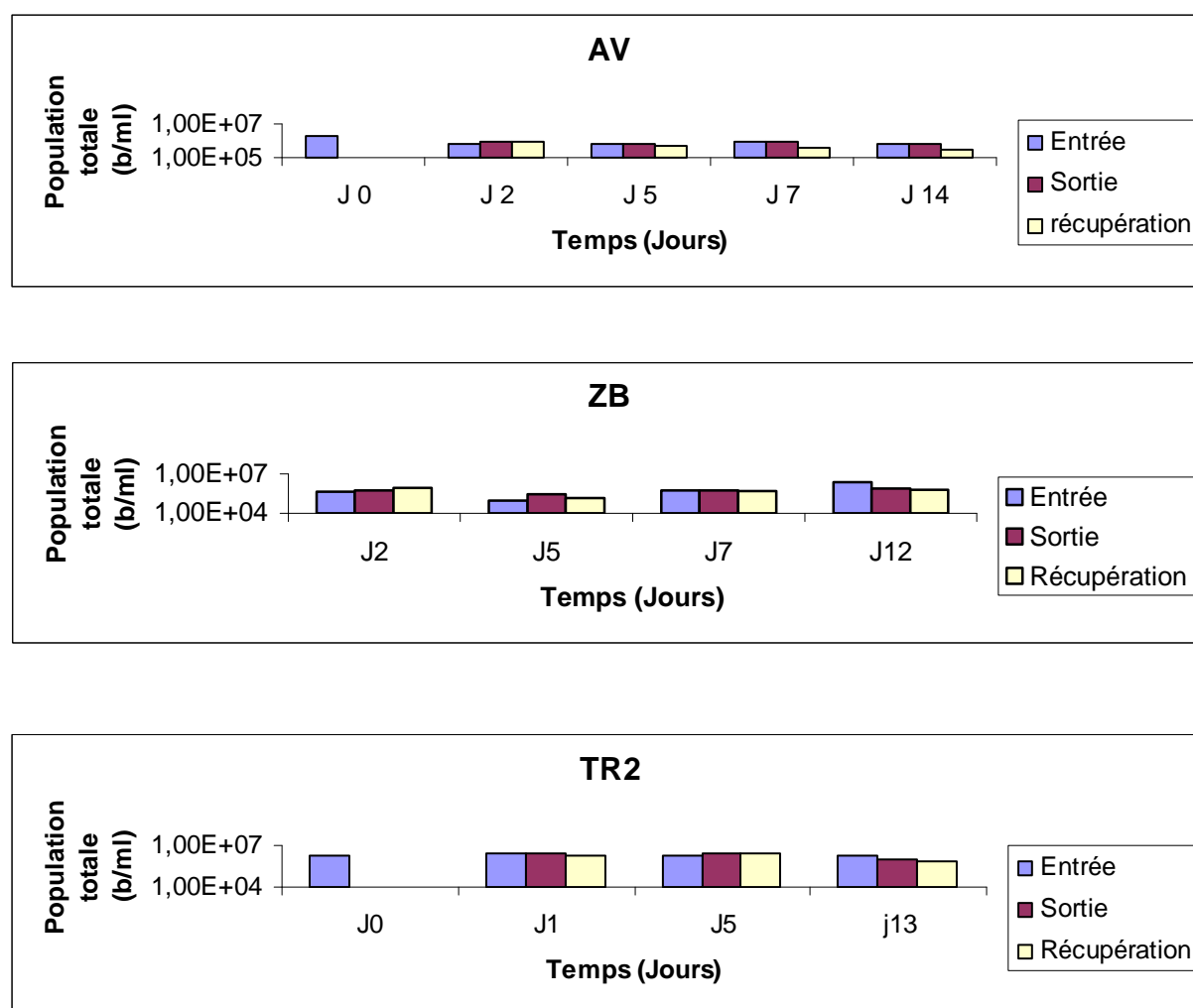


Figure 74 : Evolution des populations totales de bactéries avant et après passage dans le pilote (précision de la méthode : $\pm 10\%$)

La Figure 74 montre que les concentrations bactériennes au cours du temps évoluent peu avant et après passage dans le bioréacteur et sont proches le plus souvent de 10^6 b/ml indépendamment des eaux étudiées. Les eaux de la station TR2 (date du prélèvement : Mars) contiennent des concentrations supérieures à 10^6 b/ml durant toute la durée de l'élaboration du biofilm alors que les eaux des autres stations ont des concentrations très souvent inférieures à ce seuil (10^5 b/ml). L'eau prélevée sur la station TR2 est plus riche en bactéries ce qui est certainement liée aux apports anthropiques important ayant lieu pendant cette période de l'année apportant ainsi des nutriments favorables à leurs croissances.

Synthèse des résultats et corrélations par l'approche multidimensionnelle

Bien qu'un peu fastidieuse à appréhender, l'étude séparée des données sur les eaux a fait apparaître certaines tendances qui devraient se voir confirmées lors d'une analyse multidimensionnelle. Nous avons donc réalisé une ACP prenant en compte tous les paramètres mesurés sur les eaux d'entrée et de récupération. Dans cette approche, 4 composantes ont été extraites qui représentent ensemble 76,6% de la variance totale comme le montre le tableau 21.

Tableau 21 : Matrice des composantes établie à partir des paramètres physico-chimiques et microbiologiques

| | Composantes | | | |
|-------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| | 1(29,26%) | 2(20,28%) | 3(15,71%) | 4(11,64%) |
| COD | ,889 | -,140 | ,011 | ,102 |
| COT | ,878 | ,035 | -,083 | -,029 |
| Conductivité | -,840 | ,111 | ,082 | ,102 |
| Si | ,808 | -,235 | ,470 | -,057 |
| Bactéries totales | ,799 | ,199 | ,261 | ,065 |
| Al | ,735 | ,058 | ,598 | ,108 |
| pH | ,704 | ,524 | ,029 | ,134 |
| fluoT | -,637 | -,066 | -,007 | ,632 |
| fluoB | -,626 | -,390 | ,091 | ,305 |
| diatomées | ,018 | ,899 | ,126 | -,166 |
| cyanobactéries | -,054 | -,894 | ,049 | -,213 |
| Nt | ,277 | ,766 | -,294 | ,345 |
| inconnues | ,183 | -,644 | ,255 | -,139 |
| Turbidité | -,025 | ,483 | ,346 | -,303 |
| P | ,028 | -,077 | ,939 | ,092 |

| | | | | |
|--------|-------|-------|-------------|-------------|
| Fe | ,317 | -,026 | ,913 | ,097 |
| Mn | -,537 | -,133 | ,726 | ,034 |
| fluorA | ,066 | ,487 | ,039 | ,800 |
| fluorC | ,093 | ,434 | ,140 | ,798 |
| O2 | -,235 | ,031 | ,036 | ,718 |
| algues | -,042 | -,268 | -,387 | ,630 |

(suite et fin Tableau n°21)

Nous rappelons que pour chaque composante, ce sont ces variables qui vont permettre d'attribuer à chacune des composantes un rôle particulier dans le « fonctionnement » des eaux. C'est ainsi que la composante 1 décrite par le carbone organique, la silice, les bactéries totales, l'aluminium dans sa partie positive et la conductivité, les fluorophores B et T dans sa partie négative, explique une partie de la transformation de la matière organique.

La composante 2 décrite par les diatomées, l'azote total et la turbidité dans la partie positive et les cyanobactéries, dans sa partie négative explique le développement antagoniste des cyanobactéries et des diatomées en relation avec l'azote total et la turbidité. La composante 3 est décrite par le Phosphore, le Fer, le Manganèse, l'Aluminium et dans une moindre mesure le Silicium.

La composante 4 essentiellement décrite par les fluorophores A, C et en partie le fluorophore T, l'oxygène dissous et les algues dans sa partie positive est relativement difficile à interpréter bien que représentant pour l'essentiel les matières organiques naturelles (fluorophores A et C).

La Figure 75 représente la projection des individus (stations) dans le plan des composantes 1 et 2.

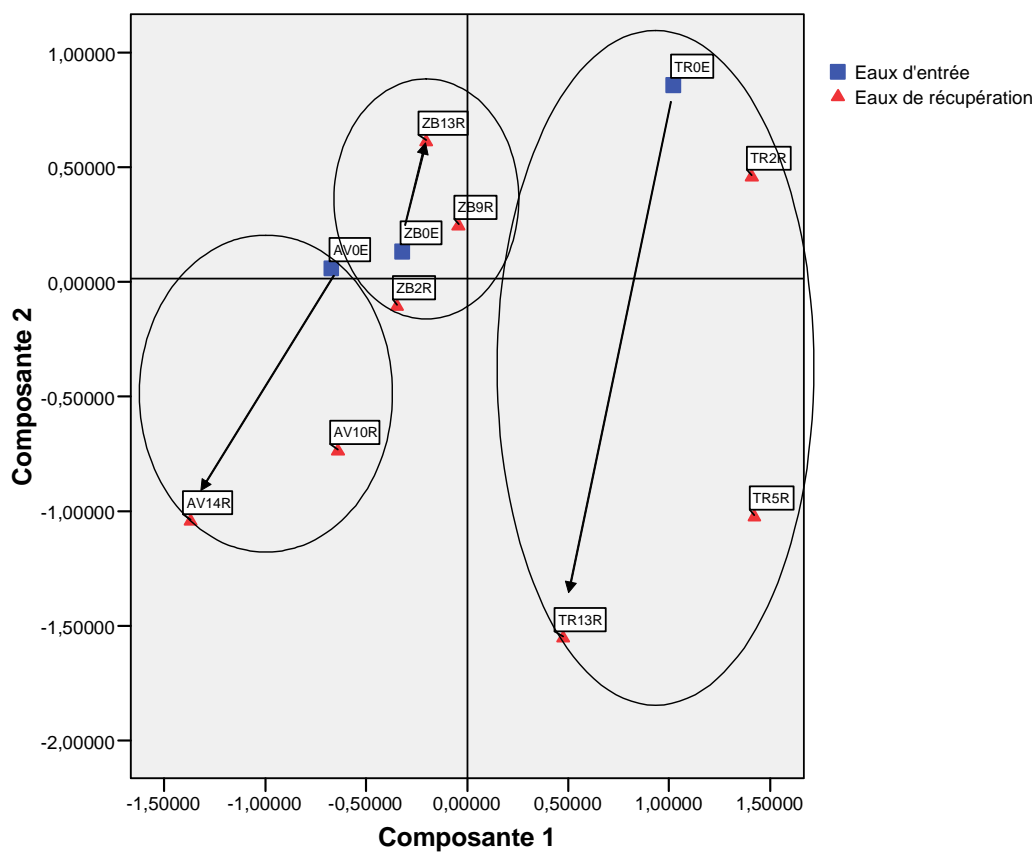


Figure 75 : ACP représentant la projection des stations TR, AV, ZB sur plusieurs jours dans le plan des 2 premières composantes

La Figure 75 qui décrit l'évolution des eaux ZB, TR et AV lors de leur passage dans le bioréacteur montre que :

- les stations TR (1), ZB (2) et AV (3) évoluent globalement le long de la composante 1 qui caractérise comme on l'a vu précédemment une plus ou moins grande transformation de la MO.
- Pour chaque eau, les transformations opérées par le bioréacteur se manifestent par un déplacement du point représentatif le long de la composante 2. Pour la station ZB, vers la partie positive favorisant le développement des diatomées, pour les autres stations, vers la partie négative de cette composante favorisant le développement des cyanobactéries (flèches).

La Figure 76 représente l'évolution dans le plan des composantes 1 et 3.

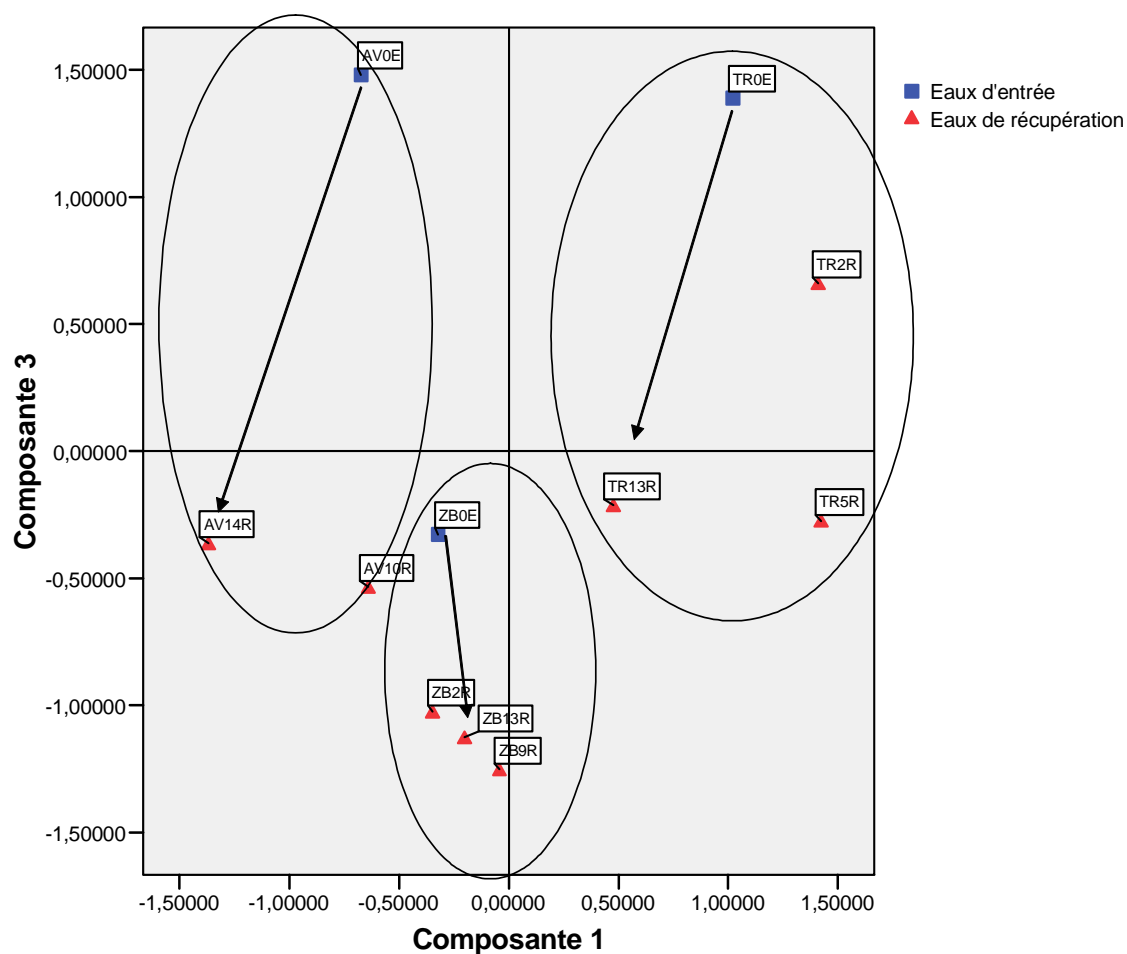


Figure 76 : ACP représentant la projection des stations TR, AV, ZB sur plusieurs jours dans le plan des composantes 1 et 3

Pour toutes les stations, tout se déplace vers la partie négative de la composante 3 en engendrant un appauvrissement des éléments mineurs.

La Figure 77 représente la projection des stations à partir des composantes 1 et 4.

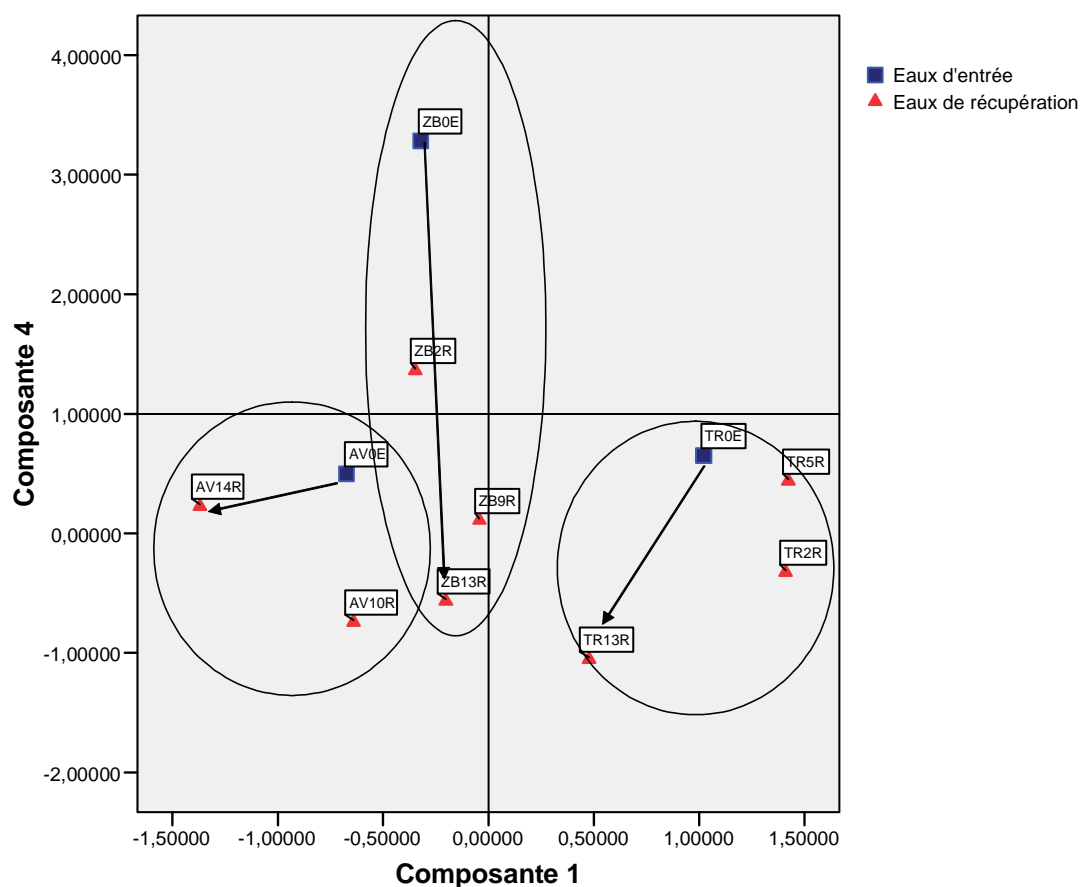


Figure 77 : ACP représentant la projection des stations TR, AV, ZB sur plusieurs jours dans le plan des composantes 1 et 4

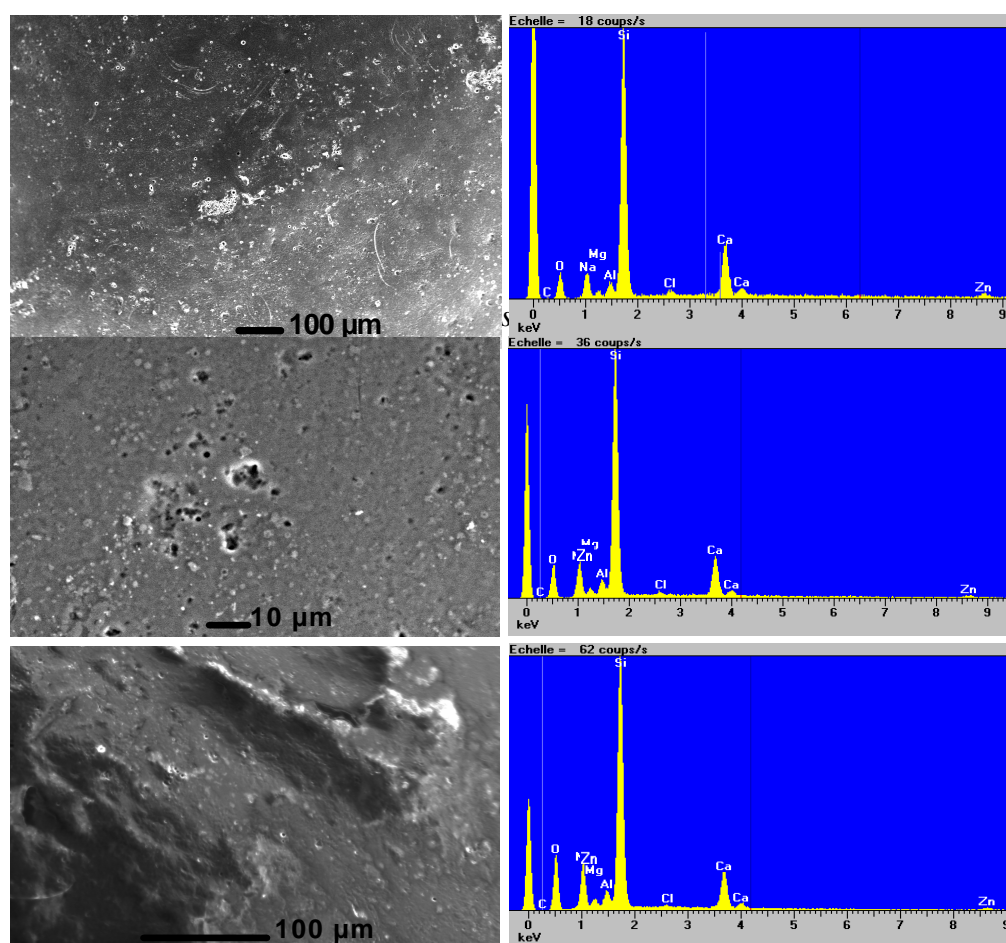
Un fort déplacement vers la partie négative de la composante 4 est visualisé correspondant à une diminution des fluorophores A et C (substances humiques) par transformation. La station AV évolue d'abord vers la diminution des fluorophores A et C (AV10) puis vers l'augmentation des fluorophores B et T (AV14) qui peuvent être la résultante de la transformation des fluorophores A et C.

Les caractéristiques d'une eau influencent la composition d'un biofilm comme il a été montré précédemment (chapitre III). Dans les paragraphes suivants, les biofilms élaborés dans un pilote avec les eaux préalablement étudiées, ont été caractérisés. Des analyses physico-chimiques et microbiologiques mettent en avant la composition de biofilms âgés d'une dizaine de jours.

IV.3/ ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES BIOFILMS

IV.3.1/ Etude du supports et effet du traitement par les ultrasons

Les biofilms ont été élaboré sur des billes de verre préalablement caractérisées par analyse de surface au MEB et analyse chimique à l'EDX comme le montre la Figure 78. Ces approches permettent de connaître la composition du support d'une part et de tester également l'efficacité des traitements par ultrasons dans le but de décrocher le biofilm d'autre part (Figure 78).



Etat de surface des billes de verre après décrochage du biofilm par ultrasons

Figure 78 : Etude des états de surface des billes de verre (support à biofilms)

La Figure 78 représente des photographies prises au MEB et les spectres EDX correspondant à l'état de surface des billes. Ces dernières ont été javelisées, puis pyrolysées pendant 3 heures à 500°C pour détruire la MO, avant d'être réutilisées dans le bioréacteur. Les résultats ne montrent pas de différences entre les billes propres et celles traitées par ultrasons pour décrocher le biofilm. En effet, cela révèle l'efficacité du traitement de

décrochage des biofilms par ultrasons. Cependant, quelques débris sont observés à la surface des billes. Seuls quelques éléments chimiques apparaissent à l'EDX comme le Zn, le Mg, l'Al, le Si, le Cl et le Ca de proportions quasi-similaires pour toutes les surfaces étudiées. Par conséquent, cela reflète bien la composition des billes. L'élément carbone n'apparaît pas à l'analyse EDX.

Le premier paramètre étudié est l'épaisseur de biofilm, ce qui paraît pertinent car nous supposons que leur composition chimique peut varier en fonction de ce paramètre.

IV.3.2/ Détermination des épaisseurs de biofilms par mesures électrochimiques

La Figure 79 montre les épaisseurs de biofilms en fonction du temps d'immersion dans le bioréacteur (jours). Ces épaisseurs sont déterminées sur les biofilms élaborés à partir des eaux de stations.

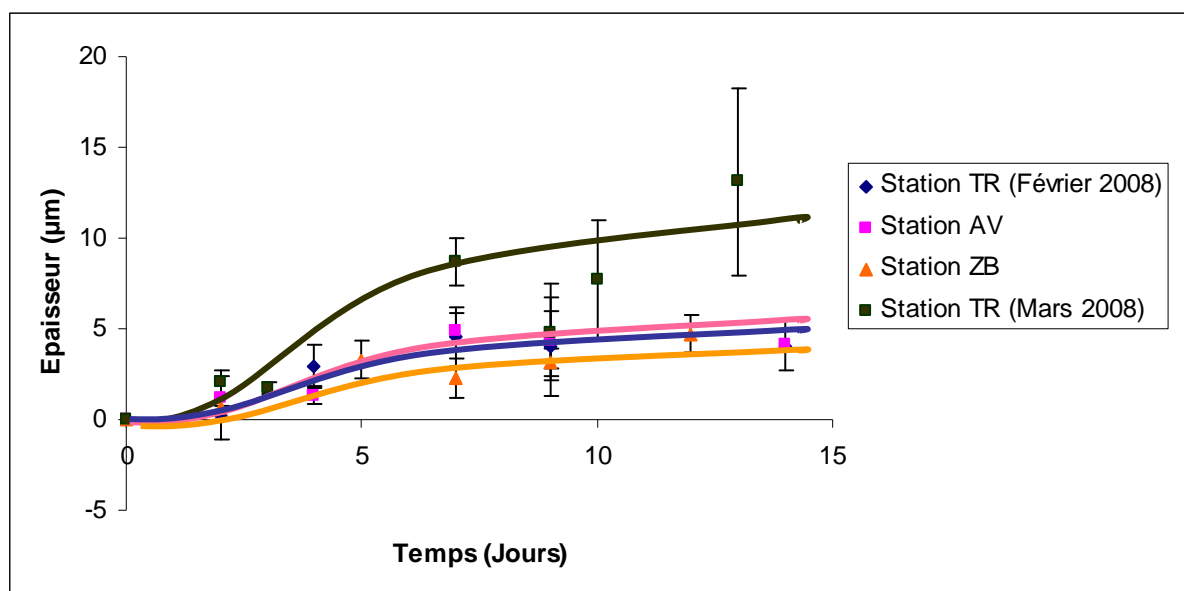


Figure 79: Suivis de la croissance de biofilms par mesures de ses épaisseurs en fonction du temps (solution de Ferri/Ferro 0,01 M, vitesse de rotation 300 tr/min, $E = -0,05V/ECS$)

La Figure 79 indique que l'évolution des épaisseurs des biofilms se divise en 3 parties avec une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire qui est généralement atteinte vers le 7^{ème} jour dans les conditions de l'étude. Le biofilm TR (Mars 2008) se distingue nettement des autres biofilms avec des épaisseurs moyennes atteignant 13 µm en fin d'expérience alors que les épaisseurs des autres biofilms sont très proches (~ 4µm). Les écarts types sont assez importants notamment pour la courbe de croissance du biofilm TR (Mars 2008). Ces résultats sont certainement liés à une hétérogénéité dans la

formation des biofilms au sein des électrodes et/ou à des décrochages plus faciles puisque le biofilm est significativement plus épais.

Il semblerait que les courbes obtenues sur l'évolution des épaisseurs en fonction du temps, aient la même allure qu'une courbe de croissance d'un biofilm (chapitre I, Figure 15).

IV.3.3/ Composition en COT, COD, azote total et dissous

La Figure 80 montre les teneurs en carbone et en azote (total et dissous) en fonction des biofilms. Elles sont exprimées en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

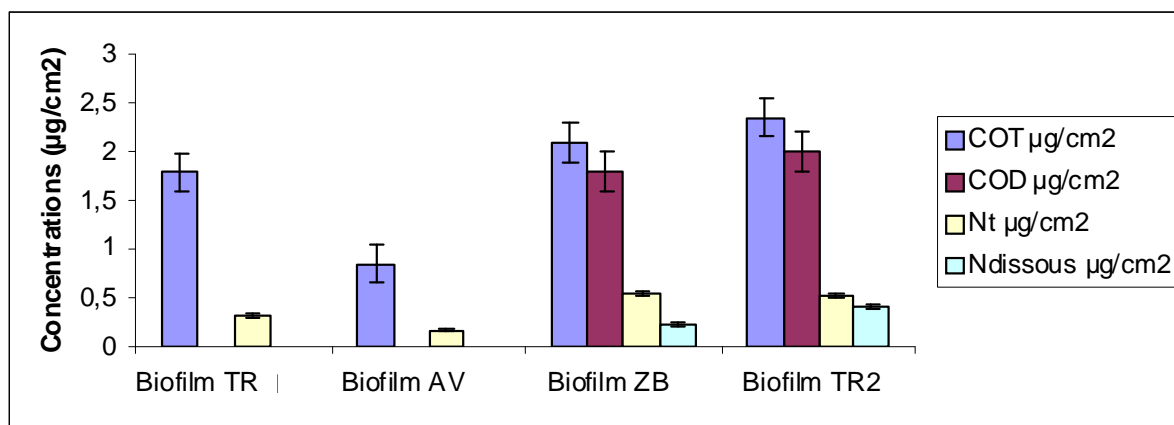


Figure 80 : Teneurs en carbone et en azote au sein des biofilms

(NB : Absence d'informations concernant le COD et N dissous des biofilms TR et AV)

Les teneurs en ces éléments sont variables selon les biofilms étudiés. Les plus faibles teneurs sont observées pour le biofilm AV et les plus fortes pour les biofilms ZB et TR2. Le biofilm TR2 est élaboré à partir de l'eau qui est la plus anthropisée. Une eau plus riche en nutriment conduirait à un biofilm plus riche en COT et COD. Cependant, il faudrait tester une multitude d'eau afin de pouvoir valider cette tendance.

Afin de caractériser cette MO contenue dans les biofilms, une analyse par pyrolyse CG-SM a été conduite.

IV.3.4/ Etude des biofilms par pyrolyse CG-SM

Pour cette étude, les principaux sous-produits de pyrolyse communs à tous les biofilms ont été sélectionnés et sont représentés dans le tableau 22. Une analyse semi-quantitative est réalisée à partir de ces pics. En rouge, sont représentés les plus forts pourcentages de sous-produits par rapport aux autres biofilms.

Tableau 22 : Analyses semi-quantitatives des principaux pics communs à tous les biofilms (précision 2 %)

| Sous produits (%) | biofilm TR | biofilm AV | biofilm ZB | biofilm TR2 |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|------------|--------------------|
| <i>5 méthylfurancarboxaldéhyde</i> | 13,8 | 15,3 | 15,5 | <u>26,6</u> |
| <i>2 éthyl-1-hexanol</i> | 13,1 | <u>24,4</u> | 22,3 | 9,7 |
| <i>3 acetamidofuran</i> | 8,3 | <u>14,2</u> | 9,9 | 6,0 |
| <i>Indole</i> | <u>14,3</u> | 12,1 | 10,6 | 9,1 |
| <i>n-hexadecanoic ac</i> | 21,4 | 17,1 | 27,9 | <u>28,4</u> |
| <i>hexadecanamide</i> | 10,4 | <u>11,4</u> | 7,1 | 8,7 |
| <i>9 octadecenamide</i> | <u>18,7</u> | 5,5 | 6,7 | 11,5 |

Les valeurs soulignées indiquent les pourcentages relatifs des abondances des sous produits les plus importants.

Le 5 méthylfurancarboxaldéhyde est un sous-produit de polysaccharides et le 2éthyl-1-hexanol, de l'activité biologique. Le 3 acetamidofuran (aminosucres) correspond à un marqueur des parois bactériennes.

L'indole est un sous-produit des protéines révélant une activité aquagénique (algues et phytoplancton).

L'acide n-hexadecanoïque est un sous produit de la famille des lipides issus des microorganismes et ceux possédant une fonction amide sont issus de la dégradation des aminosucres.

Le tableau 22 montre que les proportions des principaux sous produits communs sont variables au sein des différents biofilms. L'ensemble de ces fragments de pyrolyse semble être caractéristique des biofilms élaborés sur des billes de verre, à partir des eaux de surfaces de lacs et de rivières, car ils sont retrouvés à chaque fois. Cependant, certains pics de sous-produits de pyrolyse sont caractéristiques de certains biofilms. En effet, l'étude suivante a montré que quelques pics apparaissant au sein du biofilm ZB sont très différents par rapport aux 3 autres biofilms étudiés.

IV.3.5/ Comparaison des biofilms et des fractions HPO et TPH des eaux d'alimentation et de récupération (station AV) par pyrolyse GC/MS

Le tableau 23 indique la présence (P (bleu)) ou l'absence (A) des principaux fragments de pyrolyse rencontrés dans chaque échantillon analysé (biofilms, HPO, TPH).

Tableau 23 : Comparaison des principaux pics entre des échantillons de biofilms et de MO mis en évidence par pyrolyse CG/SM (P indique la présence d'un produit)

| Peaks | TR | AV | ZB | TR2 | HPOinput | HPOoutput | TPHinput | TPHoutput |
|-------------------------------|----|----|----|-----|----------|-----------|----------|-----------|
| 5-methylfurancarboxaldehyde | P | P | P | P | | | P | P |
| 2-ethyl-1-hexanol | P | P | P | P | | | | |
| 3 acetamidofuran | P | P | P | P | | | | |
| Indole | P | P | P | P | | | | |
| Ac dodecanoïque | | P | P | P | | | | |
| Ac Hexadecanoïque | P | P | P | P | | | P | P |
| Hexadecanamide | P | P | P | P | | | | |
| 9 octadecenamide | P | P | P | P | | | P | P |
| bis-(2-ethylhexyl)phthalate | P | P | P | P | | | P | P |
| Cholesta 3,5 diène | P | | | | | | | |
| 2 Furanmethanol | | | | | | | P | |
| 2,6,6 trimethylbicycloheptane | | P | P | | | | | |
| Toluene | | | | | P | P | | |
| Xylene | | | | | P | P | | |
| Benzene (dérivés) | | | P | | P | P | | |
| Ethylbenzene | | | | | P | P | | |
| Ac Acétique | | | | | P | P | | |
| Furfural | | | | | P | P | | |
| Ac Propanoïque | | | | | P | P | | |
| Ac 2-Methylpropanoïque | | | | | P | P | | |
| Ac propénoïque | | | | | P | P | | |
| Phenol | | | | | P | P | | |
| 4-Méthylphenol | | | | | P | | | |
| 2-Cyclopenten-1-one | | | | | P | P | | |
| Pyridine or dérivés | | | | | | | P | P |
| Benzene dicarboxylique | | | P | | | | | |
| 2-butanone | | | | | | P | | |
| Ac pentanoïque | | | | | | | | P |
| Dibutylphthalate | | | P | | | | | |
| Ac tétradécanoïque | | | | | | | | P |
| Benzene sulfonamide Nbutyl | | | | | | | | P |
| 4-Ethyl-5-méthylthiazole | | | | | | | P | P |

Le tableau 23 montre que la composition des biofilms est plus proche des fractions TPHs que des fractions HPOs. En effet, les sous produits de pyrolyse comme le 5-méthylfurancarboxaldéhyde, l'acide hexadécanoïque, le 9-octadécenamide et le bis-(2éthylhexyl) phtalate (marqueur anthropique) sont à la fois retrouvés dans les biofilms et les fractions TPHs. Cela signifie que ces sous-produits sont issus de composés qui sont dissous

dans l'eau puisque les fractions TPHs sont obtenues à partir d'une eau naturelle ayant été préalablement filtrée sur 1 μ m. C'est aussi la raison pour laquelle, il n'apparaît pas de 3-acetamidofuran qui est un sous produit issu de la pyrolyse des parois bactériennes (matière organique particulaire). Seul le biofilm ZB est assez différent des autres biofilms. En effet, ce dernier est fortement marqué par la présence de dérivés de benzène et de benzène dicarboxylique probablement dérivés d'hydrocarbures naturels ou anthropiques. La présence de dibutylphthalate issu de la pyrolyse de ce biofilm correspond à un marqueur anthropique.

Une étude complémentaire des biofilms par fluorimétrie 3D a été effectuée afin de confirmer les résultats précédents.

IV.3.6/Etude des biofilms par fluorimétrie 3D

Cette étude permet de mettre en évidence certains types de MO comme les substances humiques de type A et C qui sont caractéristiques des fractions HPO et les fluorophores B et T de l'activité microbienne.

La Figure 81 représente des Matrices d'Excitation-Emission de fluorescence 3D réalisées à partir de biofilms mis en suspension dans de l'EUP.

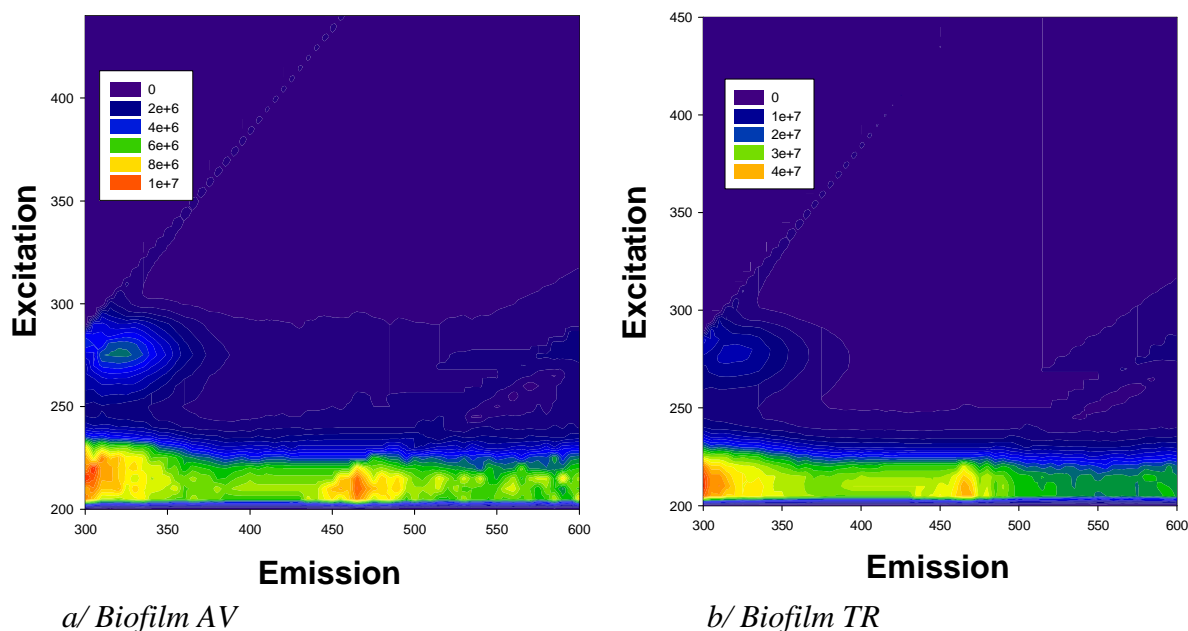


Figure 81 : Matrices d'Excitation-Emission de fluorescence 3D réalisées à partir de biofilms mis en suspension dans de l'EUP.

Cette étude confirme les résultats de pyrolyse GC-MS en montrant que la MO contenue dans le biofilm est très différente de la MO qui constitue les HPOs. En effet, les

résultats sont mis en évidence par l'absence des fluorophores A et T (substances humiques). Cependant, la présence du fluorophore B au sein des 2 biofilms révèle bien une activité bactérienne et confirme les résultats obtenus par pyrolyse GC-MS.

NB : Les fluorescences apparaissant en dessous de 240 nm en excitation ne sont pas exploitables en fluorimétrie 3D.

IV.3.7/ Composition en éléments majeurs et mineurs (ICP-OEP et analyse EDX)

IV.3.7.1/ Teneurs en éléments chimiques des biofilms

La Figure 82 montre les teneurs en éléments chimiques exprimées en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ au sein des biofilms.

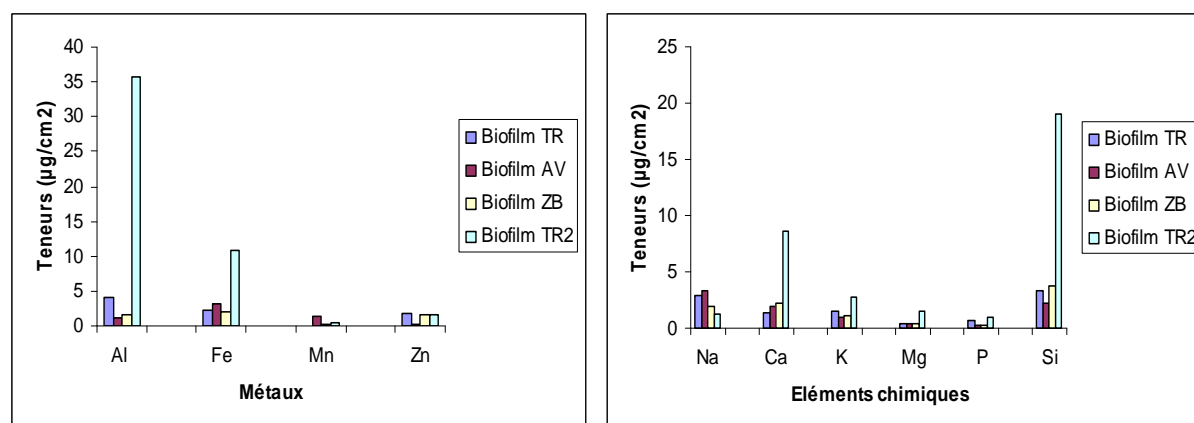


Figure 82: Teneurs en éléments chimiques ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) des biofilms

La Figure 82 met en évidence les teneurs en éléments chimiques des biofilms. Les métaux majoritairement présents sont Al, Fe, Mn et Zn. Ces résultats sont bien corrélés avec l'étude des eaux. Les principaux éléments également retrouvés dans les biofilms sont le Na, le Ca, le K, le Mg, le P et le Si. La détermination d'un indice d'incorporation a permis de mettre en évidence les espèces qui sont le mieux incorporées. Cet indice représente le rapport entre le pourcentage massique d'un élément chimique du biofilm sur le pourcentage massique de cet élément dans l'eau d'alimentation (Parinet, 2005). La Figure 83 représente les indices d'incorporation au sein d'un biofilm de chaque élément.

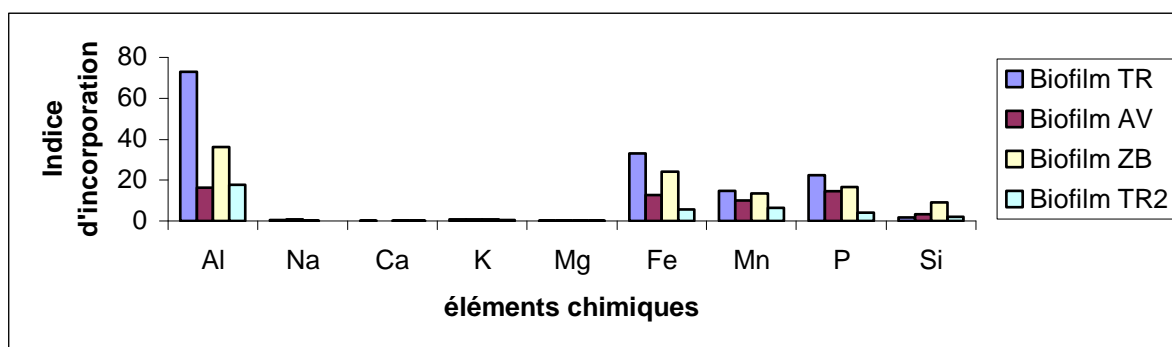


Figure 83 : Détermination des indices d'incorporation pour chaque élément chimique

La Figure 83 montre que les éléments les mieux incorporés dans le biofilm sont le Fer, le Mn, le P, le Si, et l'Al. Ces éléments présents en faibles concentrations dans les eaux sont mieux incorporés que les éléments majeurs (Ca, Na, K, Mg). Le P est bien intégré car il constitue un élément essentiel à la vie des microorganismes présents dans les biofilms. Le Silicium peut être présent sous forme de silicates. Il est aussi un élément constitutif des parois des diatomées et ces microorganismes sont largement représentés au sein des biofilms étudiés. Le Fe, le Mn et l'Al, interviennent dans les cycles rédox.

Les teneurs en éléments chimiques sont assez différentes selon les biofilms étudiés et surtout certains éléments comme le Fe, Al, Si, Ca sont présents en abondance au sein du biofilm TR2 alors que le temps de colonisation est identique. Ces différences nettes peuvent s'expliquer par une épaisseur plus importante de ce biofilm, ou alors, ce dernier a une densité plus importante. La détermination du paramètre « épaisseur » va permettre de raisonner en unité de volume de biofilm et non plus en unité de surface. Cette approche est plus judicieuse car l'«entité biofilm» constitue une structure en 3 dimensions.

L'équation 9 permet alors de déterminer les concentrations massiques moyennes apparentes (app) de chaque élément chimique dans un biofilm élaboré sur billes de verre.

$$[X]_{app} = \frac{m}{Nt \times [\frac{4}{3} \pi (r + \varepsilon)^3 - \frac{4}{3} \pi (r)^3]} \quad \text{Equation 9}$$

avec $[X]_{app}$: oncentration massique moyenne apparente d'un élément X, Volume de biofilm sur une bille exprimé en cm^3 : $\frac{4}{3} \pi (r + \varepsilon)^3 - \frac{4}{3} \pi (r)^3$, Nt : Nombre total de billes et m : masse de l'élément contenu dans 200 ml de biofilm en suspension (volume dans lequel sont placés les billes de verre)

Les biofilms issus des capteurs et issus des billes de verre sont élaborés simultanément avec la même eau. Par conséquent, nous pouvons considérer que ces biofilms ont une composition proche, même si les supports ne sont pas les mêmes et conduisent certainement à des différences d'épaisseurs entre les billes et les capteurs. C'est pourquoi, il est plus prudent d'utiliser le terme de concentrations apparentes, déterminées grâce à l'équation 9 qui reste une approximation, mais qui peut mettre en évidence des différences entre une unité de surface et une unité de volume. Ces éventuelles différences seraient liées à l'intégration des métaux qui dépendrait de l'épaisseur des biofilms. La Figure 84 montre les concentrations massiques des principaux éléments chimiques du biofilm, calculées à partir de l'équation 9 intégrant le paramètre « épaisseur de biofilm ».

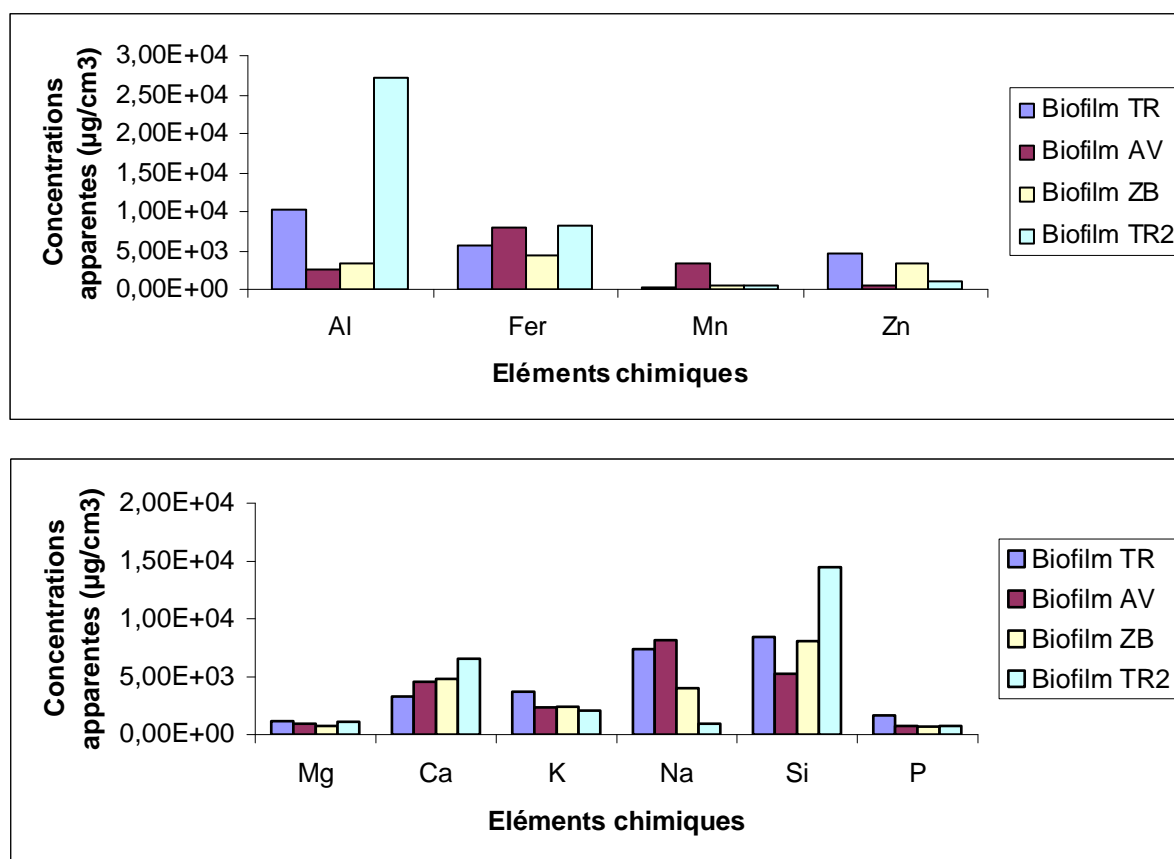


Figure 84 : Concentrations des éléments chimiques au sein d'un biofilm

Ces résultats montrent que lorsque l'on compare les concentrations entre tous les éléments contenus dans tous les biofilms, le biofilm TR2 apparaît nettement plus concentré en Si et en Al, alors qu'en s'exprimant par unité de surface, les concentrations de Fer et de Ca sont aussi très élevées. Cela signifie que les concentrations de ces éléments ne dépendent pas ou peu de l'épaisseur des biofilms contrairement au Si et Al. Ces résultats peuvent s'expliquer

par le fait que les diatomées présentes dans les biofilms, contribuent à un apport de Si conséquent. De plus, le biofilm TR2 était visible à l'œil nu (pas le cas pour les autres biofilms) sur les différentes électrodes dont l'étude microscopique a confirmé la présence d'algues et de diatomées. Des études préalables de biofilms épiphytiques ont montré également que l'Al était bien réparti entre autres sur les zones constituées de diatomées (chapitre III, cartographie/élément). Ces résultats sont bien en accord avec les résultats obtenus. Il est possible que l'Al puisse se fixer sur les diatomées et cela expliquerait le lien entre nos observations. De plus, il existe dans la nature de nombreux complexes minéraux à base de Si et Al.

Afin de confirmer les résultats obtenus par ICP-OES, une analyse complémentaire des éléments chimiques par microanalyse EDX a été effectuée sur les biofilms lyophilisés.

IV.3.7.2/ Comparaison entre 2 méthodes analytiques : EDX et ICP-OES.

La Figure 85 indique les abondances relatives massiques entre les principaux éléments chimiques contenus au sein des biofilms. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage massique (%) à partir des différentes concentrations préalablement déterminées par ICP-OES (Figure 85a). Par le biais de l'analyse EDX, une étude semi-quantitative exprimée en pourcentage massique, est également réalisée afin de comparer les résultats obtenus (Figure 85b).

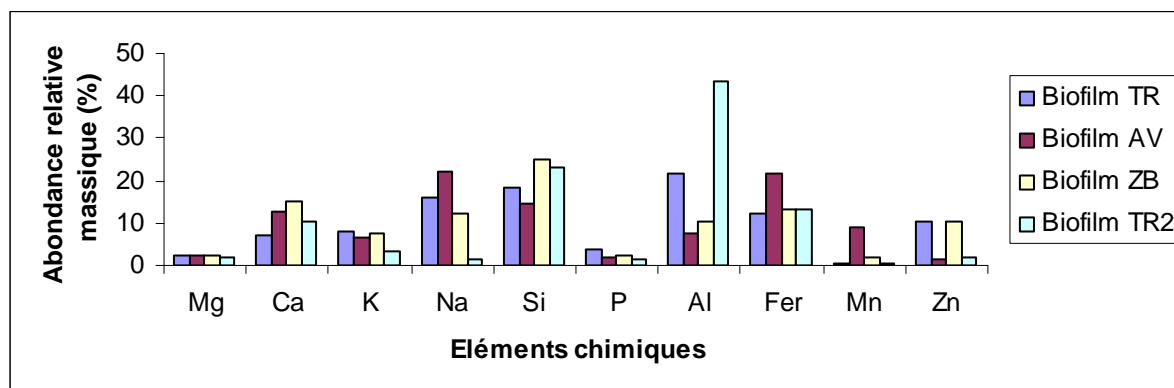


Figure 85 : Comparaison entre deux techniques d'analyses : EDX et ICP-OES.
a/ Abondance relative massique des éléments déterminée après dosage par ICP-OES

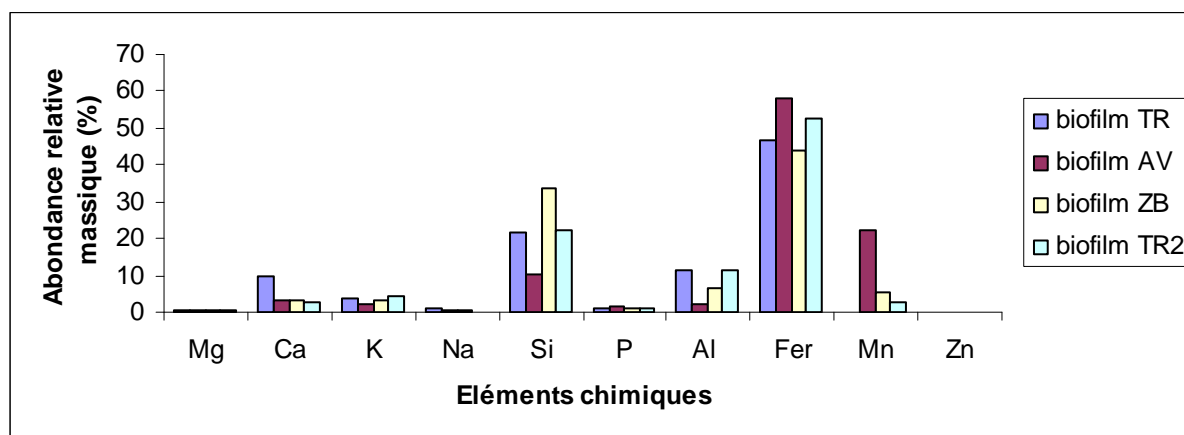


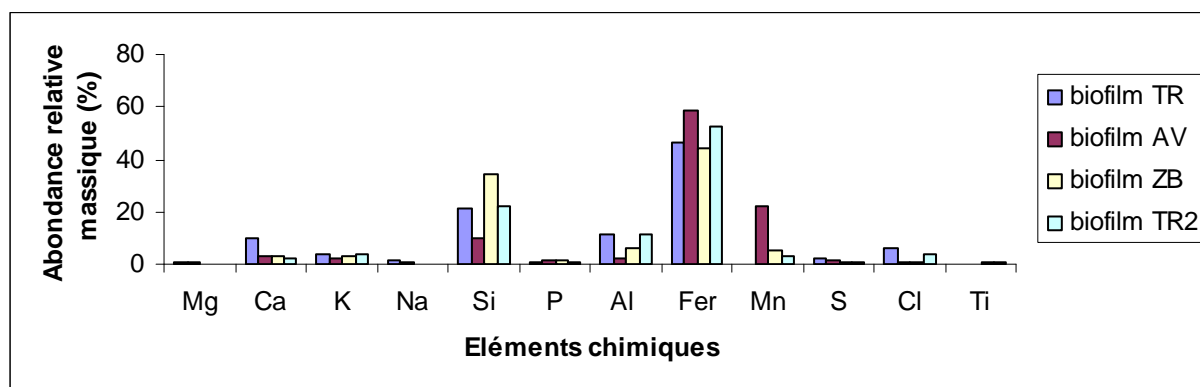
Figure 85 : Comparaison entre deux techniques d'analyses : EDX et ICP-OES.
b/ Abondance relative massique des éléments déterminée par EDX

Les résultats montrent de nettes différences entre les deux méthodes d'analyses permettant de déterminer la composition chimique. A l'analyse EDX, lorsque les éléments apparaissent, ces derniers représentent plus de 1 % massique par rapport à tous les éléments. Les éléments sont pour la plupart retrouvés dans les 2 cas à l'exception du Zinc qui n'apparaît pas à l'analyse EDX et le Na apparaît en faible abondance. Ces différences significatives sont très certainement liées au fait que certains éléments comme le Fer qui peuvent être présent sous forme d'amas seront quantitativement sous estimés par l'analyse à l'ICP-OES et apparaissant mieux à l'analyse EDX. Cela peut également être le cas pour le Si qui représentent un constituant majeur des diatomées. Par conséquent, ce dernier est susceptible d'être sous estimé en ICP-OES. D'autres éléments comme le Na sera mieux dosé à l'ICP-OES car ce dernier est plutôt diffus dans les biofilms. De plus, de nombreuses interférences entre les éléments chimiques sont susceptibles d'errer les résultats.

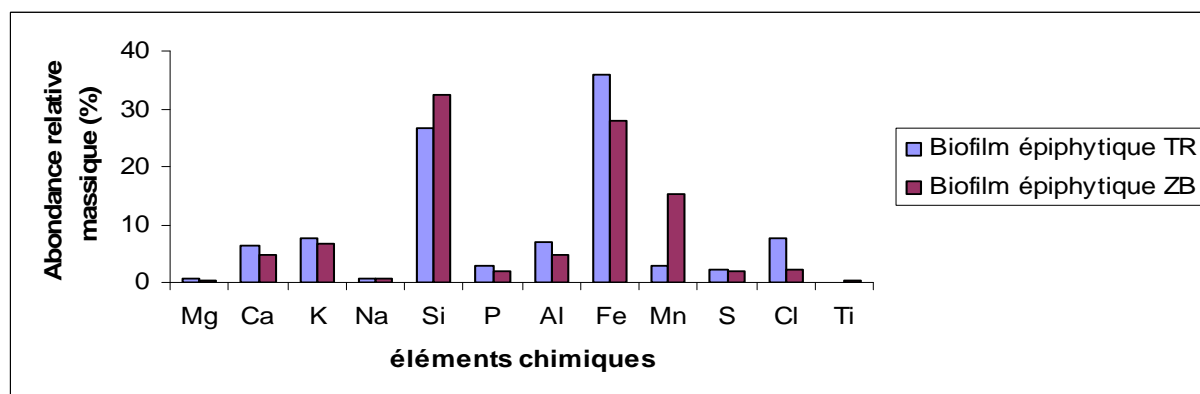
L'analyse EDX a été mise en œuvre pour l'étude comparative entre les biofilms épiphytiques et ceux ayant été élaboré au sein du bioréacteur.

III.3.7.3/ Comparaison entre biofilms épiphytiques et biofilms en bioréacteur

La Figure 86 indique les abondances relatives massiques des éléments contenus dans les biofilms élaborés au sein d'un bioréacteur et des éléments chimiques contenus au sein d'un biofilm épiphytique récupéré par décrochage *in situ*.



a/ Principaux éléments chimiques présents au sein des biofilms de bioréacteur.



b/ Composition chimique des biofilms épiphytiques

Figure 86 : Comparaison entre la composition chimique d'un biofilm élaboré dans un bioréacteur et d'un biofilm épiphytique (station TR et ZB) (précision 5 %).

La Figure 86 montre que les principaux éléments chimiques retrouvés au sein des biofilms élaborés dans un bioréacteur sont identiques à ceux retrouvés dans les biofilms épiphytiques directement prélevés dans le milieu naturel au niveau des mêmes stations, bien que les conditions physico-chimiques soient différentes. En effet, la température, le débit et la modification de la composition des eaux à cause des apports anthropiques dans le milieu naturel sont les paramètres qui diffèrent par rapport aux conditions du bioréacteur. De plus, les mêmes tendances au niveau des proportions sont observées avec prédominance de fer et de Si. Ces résultats sont similaires à ceux observés au niveau du chapitre III sur toute une campagne de prélèvement qui a duré près de 4 mois avec des proportions qui sont variables selon le temps d'immersion (visible sur les supports bambous) et la station (biofilms épiphytiques ou supports bambous).

IV.4/ ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DES BIOFILMS

IV.4.1/ Dénombrement d'algues, de diatomées et de cyanobactéries

La Figure 87 montre les proportions entre les algues, les cyanobactéries et les diatomées au sein des biofilms étudiés.

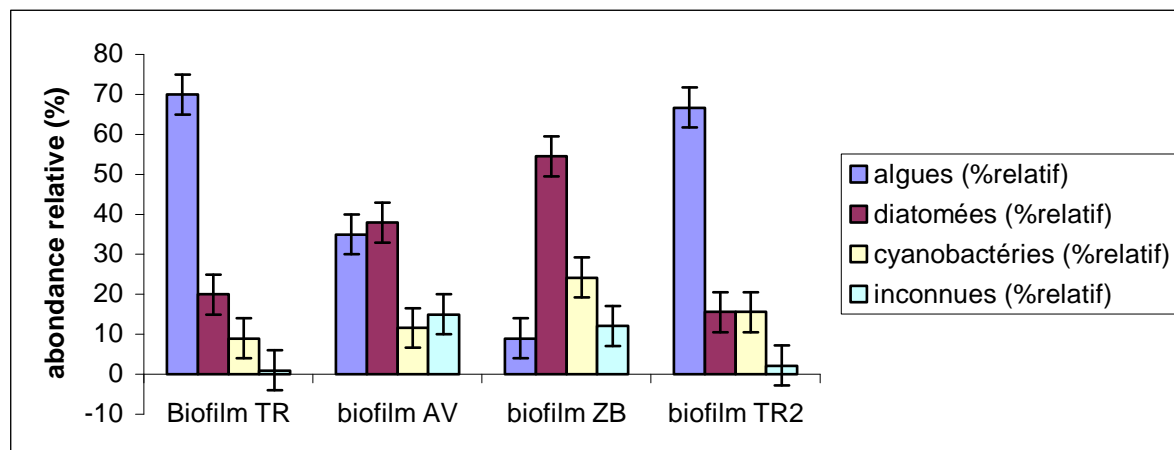


Figure 87 : Abondance relative entre algues, diatomées et cyanobactéries (en nombre d'individus) au sein des biofilms étudiés

Les proportions entre les différentes espèces étudiées sont très variables selon les biofilms. Cependant les biofilms TR et TR2 ont une composition assez proche avec un fort pourcentage d'algues par rapport aux autres espèces. Cette zone est marquée par des apports anthropiques importants (CAC, 2004 ; De Nardi, 2007). Au sein du biofilm AV, les pourcentages d'algues (environ 35%) et de diatomées (environ 35 %) sont proches, alors que le biofilm ZB contient près de 50 % de diatomées et les cyanobactéries représentent un pourcentage relatif plus élevé (dépassant 20 %). Cette zone, où a été prélevée l'eau afin d'élaborer le biofilm ZB, est plus sensible au développement des cyanobactéries (De Nardi, 2007) lorsque les conditions deviennent favorables à leur développement (augmentation de la température). Ces biofilms montrent que chacune des eaux testées ont des proportions différentes entre les 3 taxons étudiés. Confirmant les résultats obtenus antérieurement (De Nardi, 2007), les compositions des biofilms sont différentes selon les eaux testées.

IV.4.2/ Détermination de la population totale en bactéries

La Figure 88 montre la population totale des bactéries présentes au sein des différents biofilms par unité de surface (cm²).

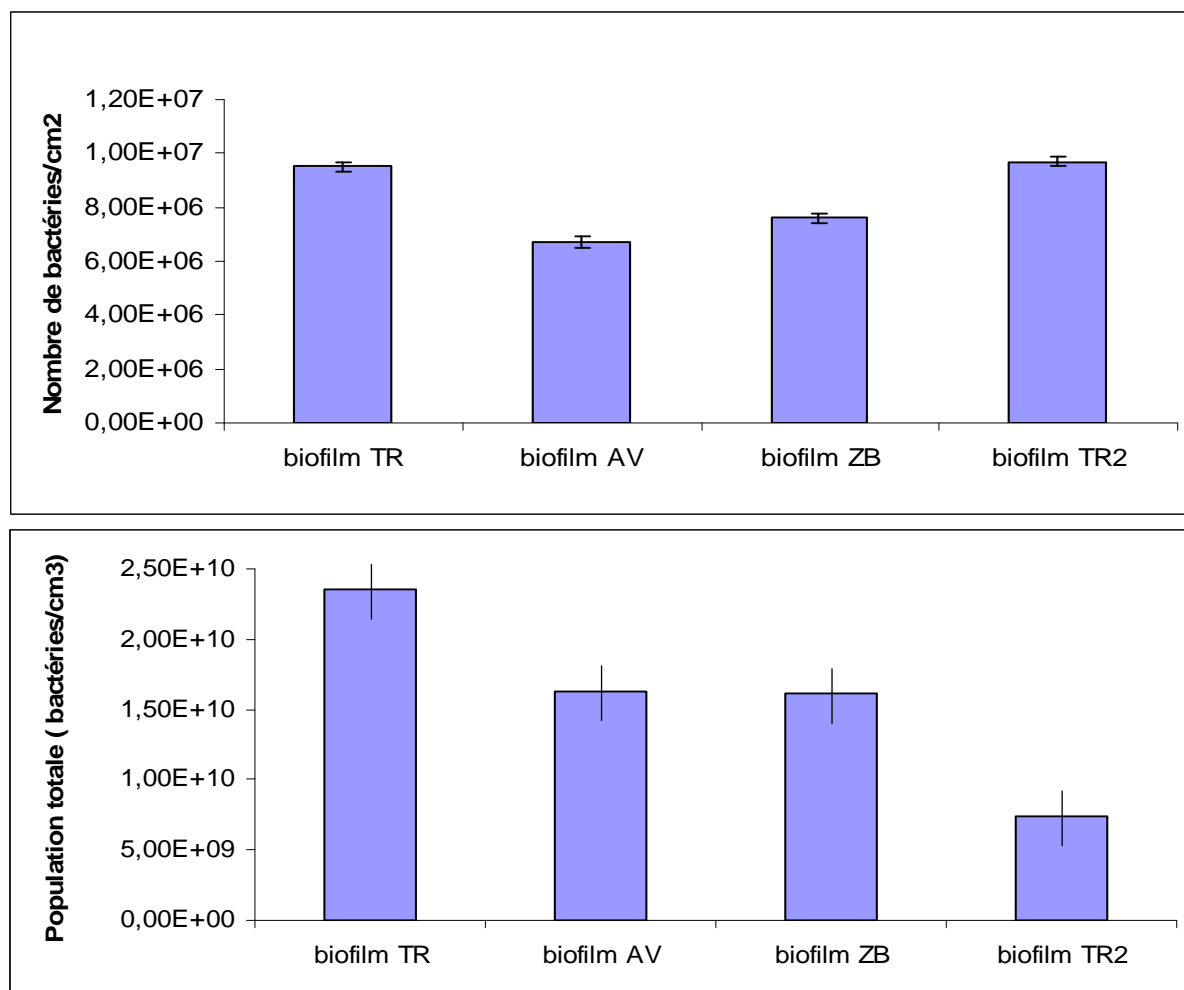


Figure 88 : Population totale de bactéries présentes dans les biofilms.

Ces résultats mettent en évidence que les biofilms TR et TR2 issus d'une eau marquée par des apports anthropiques importants (station TR) sont plus riches en bactéries (respectivement $9,5 \cdot 10^6$ et $9,7 \cdot 10^6$ bactéries/cm²) que les biofilms AV et ZB. Le biofilm réalisé avec l'eau prélevée au niveau de la station AV contient $6,7 \cdot 10^6$ bactéries/cm² et représente le biofilm le moins riche en bactéries. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que peu d'apports proviennent du lac de Verdon durant cette période de l'année (CAC 2004, De Nardi, 2007). En intégrant le paramètre « épaisseur », le biofilm TR2 s'avère être le moins concentré en bactéries bien qu'il soit le plus épais. Par conséquent, d'autres paramètres plus significatif contribuent à l'épaisseur de ce dernier et notamment les algues et les diatomées. De plus, ce biofilm est le seul qui était visible à l'œil nu, confirmant ainsi notre hypothèse.

Afin d'étudier le comportement des communautés de microorganismes présentes dans les eaux de surface et aussi dans les biofilms, une analyse des profils métaboliques est effectuée à l'aide de biolabs GN2.

IV.4.3/ Profils métaboliques des communautés de microorganismes par biolabs GN2

IV.4.3.1/ Profils métaboliques des microorganismes selon les origines

Cette approche a pour objectif de caractériser les eaux et les biofilms selon le comportement des communautés présentes dans le milieu mis en évidence par leurs profils métaboliques. La Figure 89 met en évidence les profils métaboliques des communautés de microorganismes présentes dans les biofilms élaborés dans le bioréacteur. Elle montre le pourcentage d'absorbance par rapport à l'absorbance totale obtenue par famille à 48h de chaque biofilm élaboré dans le bioréacteur.

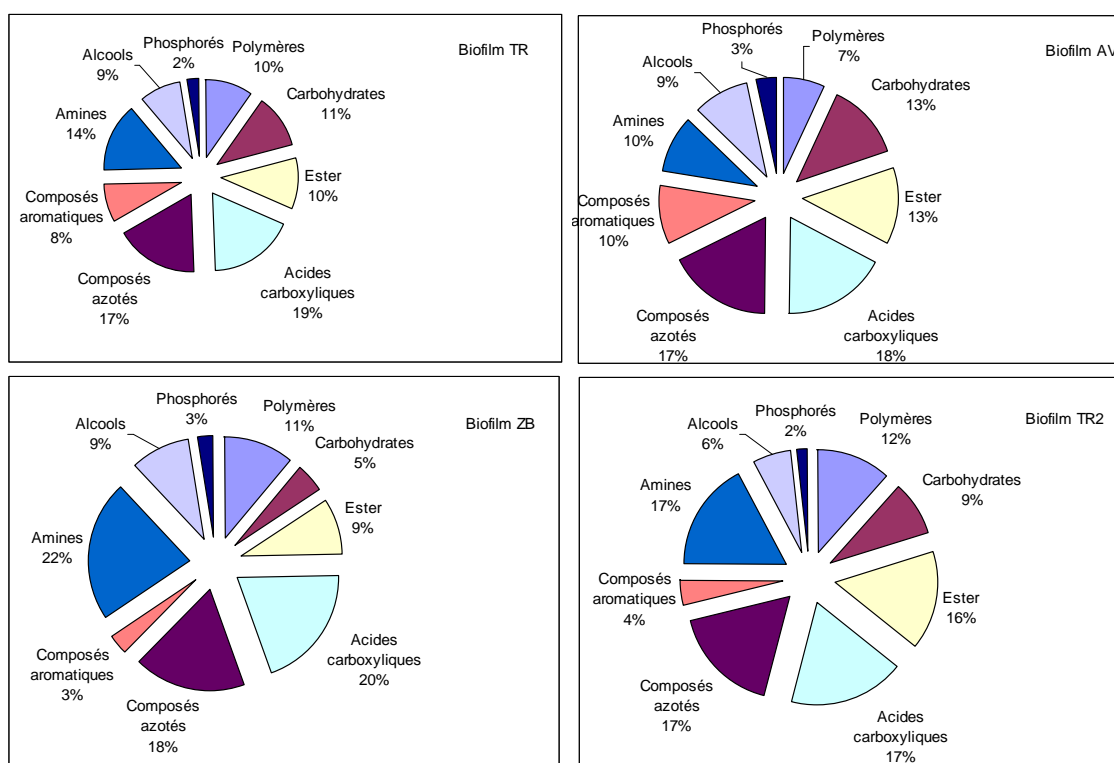


Figure 89 : Etude des profils métaboliques des communautés microbiennes présentes dans les biofilms élaborés dans le bioréacteur.

Les sources carbonées les plus utilisées par les biofilms issus des bioréacteurs sont les acides carboxyliques, les composés azotés et aminés dont les pourcentages d'absorbance dépassent nettement assez souvent les 10 %. Ces résultats sont très marqués au niveau du

biofilm ZB et TR2. Dans certains cas, les carbohydrates sont aussi très utilisés par les biofilms (biofilm TR et AV) ainsi que les esters (biofilm AV et TR2, 48h). Selon les biofilms étudiés, les profils métaboliques des communautés de microorganismes sont différents.

Nous avons également cherché à établir une comparaison des profils métaboliques des communautés microbiennes présentes dans les eaux hivernales utilisées pour l'élaboration des biofilms et des eaux récupérées en sortie du bioréacteur.

La Figure 90 montre l'étude des profils métaboliques des communautés microbiennes présentes dans les eaux hivernales avant et après passage (eau récupération) au sein du bioréacteur. Comme précédemment, sont représentés les pourcentages d'absorbance par famille en fonction du temps d'incubation.

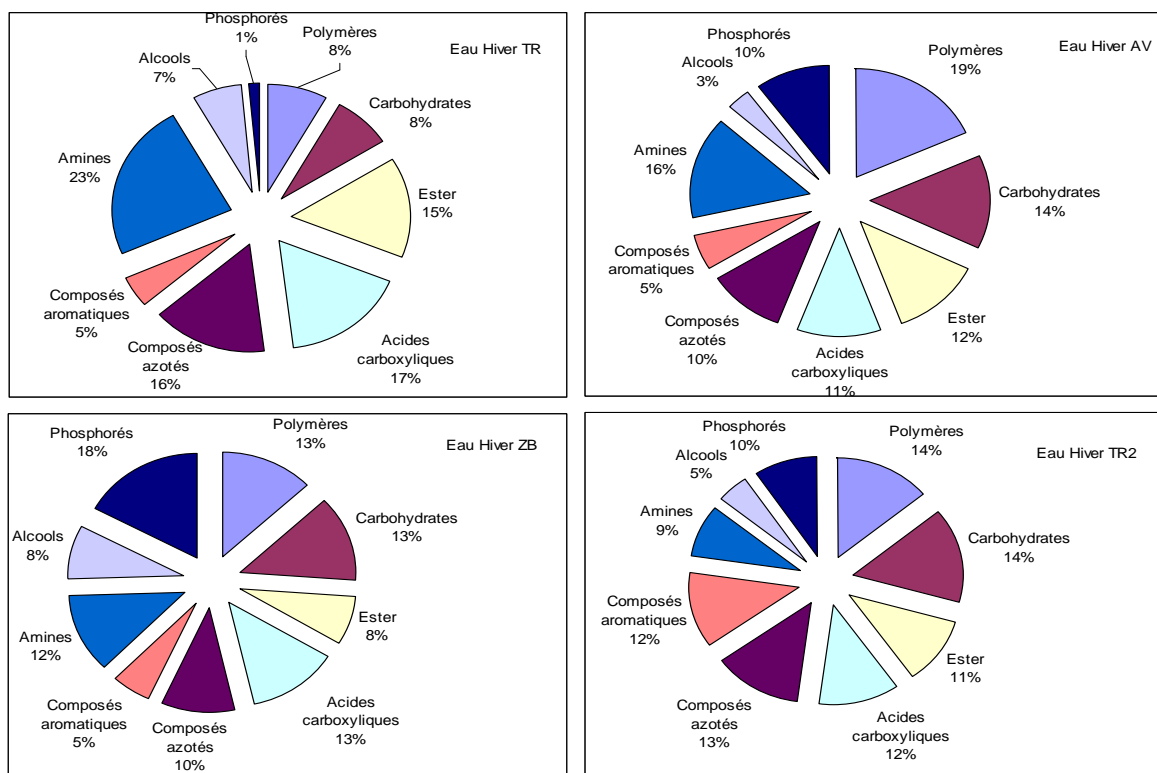


Figure 90 : Etude des profils métaboliques des communautés microbiennes présentes dans les eaux d'hiver utilisées pour l'alimentation du bioréacteur.

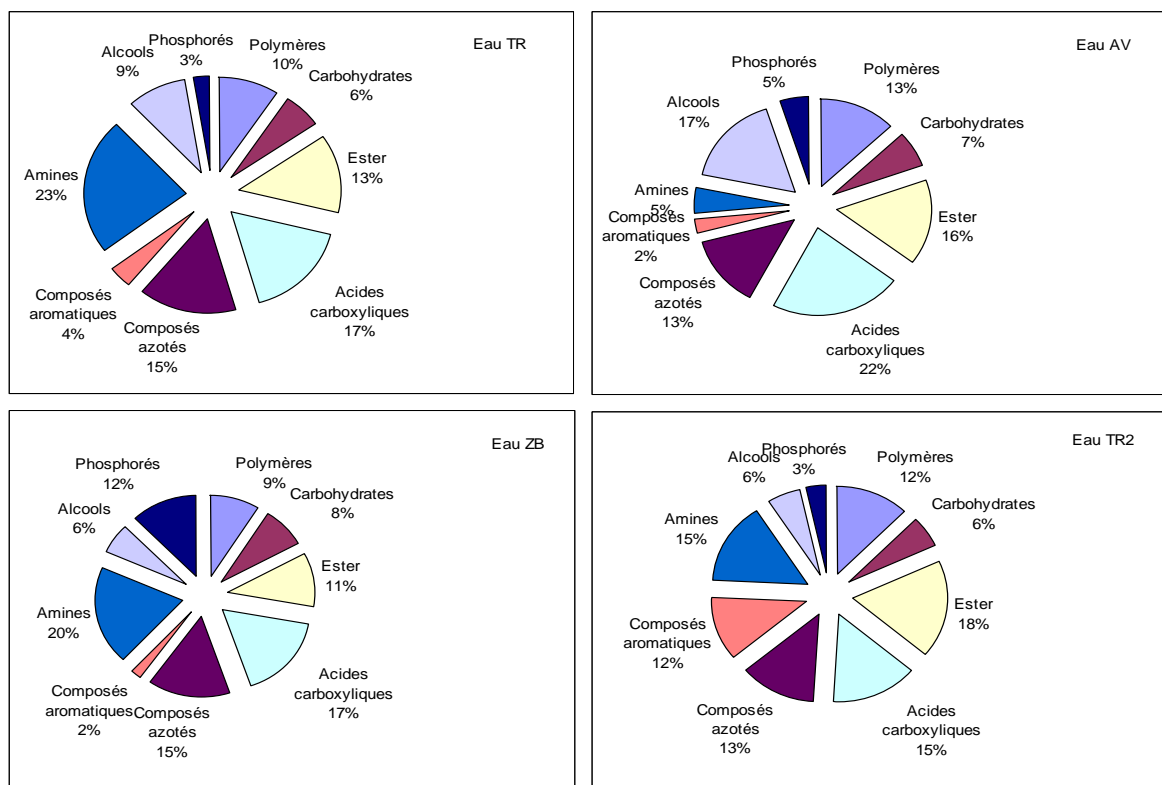


Figure 91 : Etude des profils métaboliques des communautés microbiennes présentes dans les eaux de récupération (après passage dans le bioréacteur).

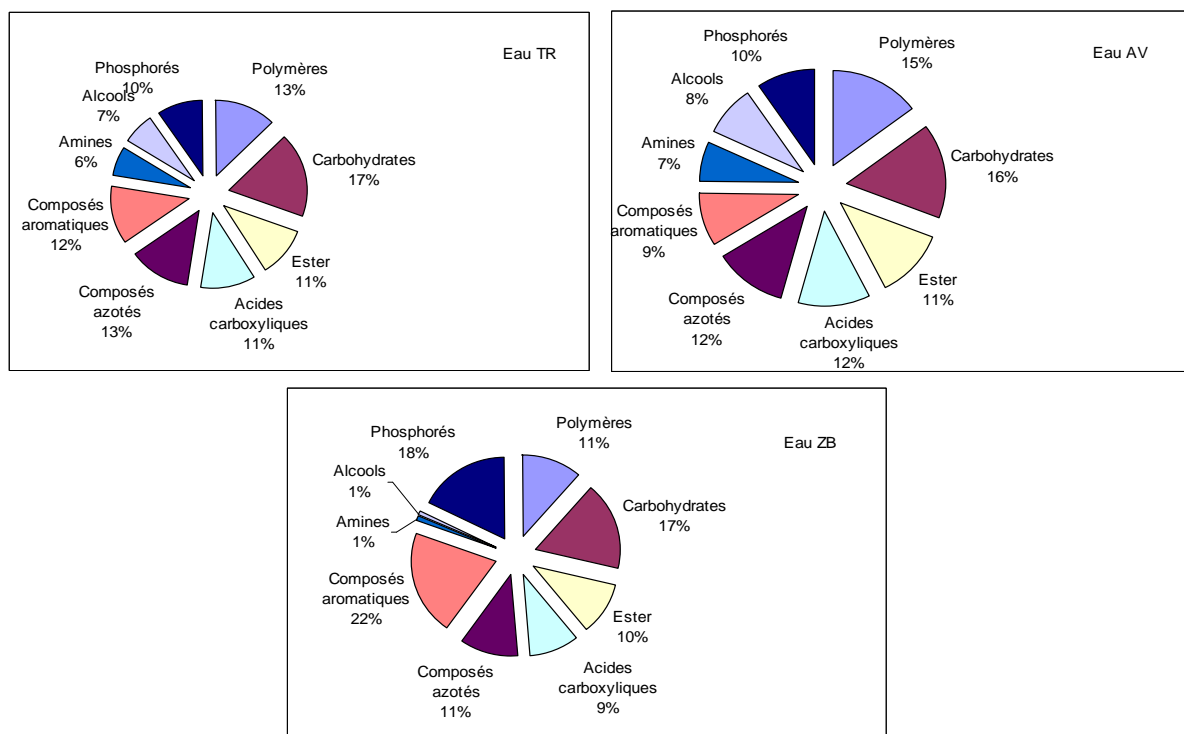
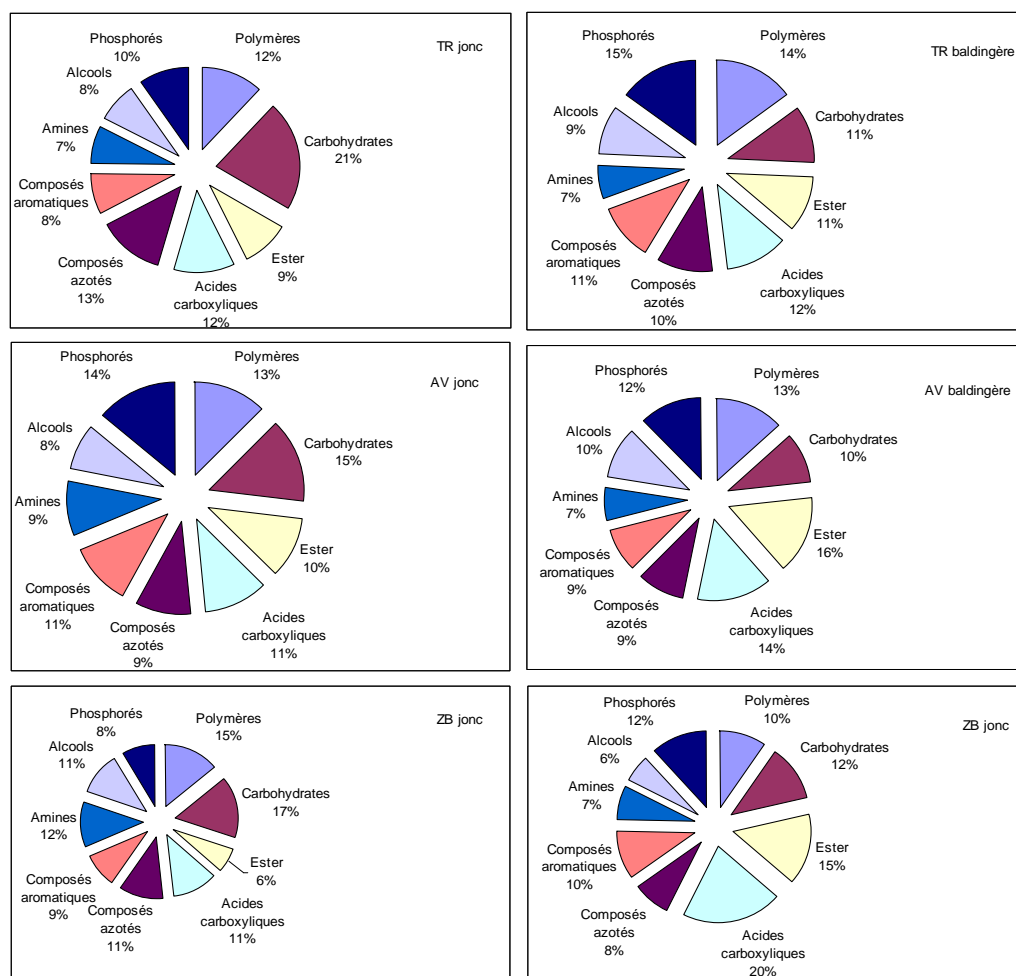


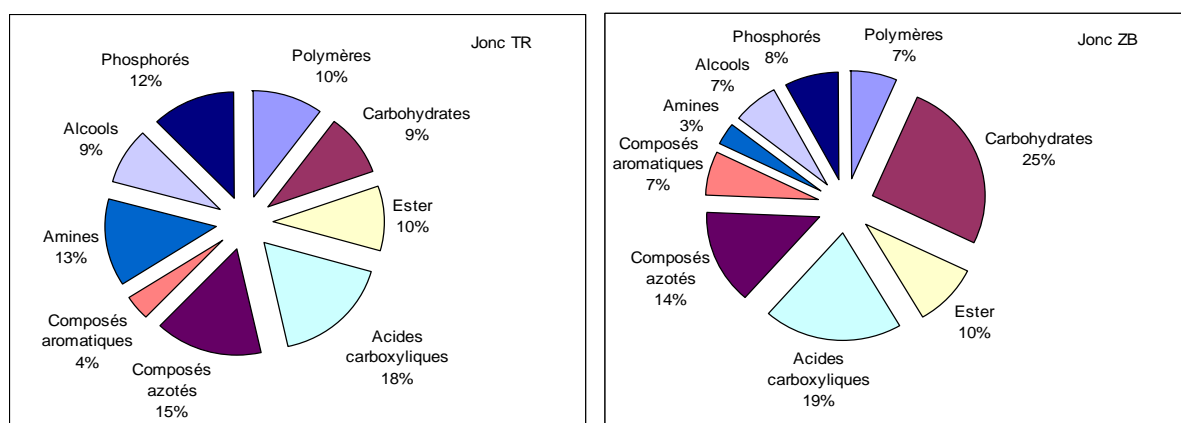
Figure 92 : Etude des profils métaboliques des communautés microbiennes présentes dans les eaux d'été.

Les résultats montrent que les eaux étudiées présentent des différences de communautés assez marquées. En effet, les communautés présentes dans les eaux d'alimentation sont variables selon les stations de prélèvements mais sont plutôt marquées par l'utilisation des carbohydrates, des polymères, des esters, des composés azotés, aminés et carboxyliques et exceptionnellement par l'utilisation des composés phosphorés (eau ZB). Les communautés présentes dans les eaux de récupération consomment majoritairement les composés aminés, les acides carboxyliques, et les esters (surtout au niveau de l'eau TR2). Des différences notables sont observées entre les eaux d'hiver, de récupération et les biofilms élaborés dans le bioréacteur.

L'étude suivante a porté sur les biofilms épiphytiques. Ces derniers ont été prélevés en période estivale (début Juillet) et hivernale (Mars). La Figure 93 présente la répartition des profils métaboliques des communautés microbiennes caractérisant les biofilms épiphytiques. Les végétaux sur lesquels les études ont été conduites sont les joncs et les baldingères (*Phalaris arundinacea*).



a/ Biofilms épiphytiques été



b/ Biofilms épiphytiques d'hiver

Figure 93 : Etude des profils métaboliques des communautés microbiennes au sein de biofilms épiphytiques.

Le profil métabolique des biofilms épiphytiques est assez variable selon les stations de prélèvements et aussi dépendant de la végétation. En effet, les biofilms 3j et 3j2 qui sont directement issus de tiges de joncs prélevés au niveau de la station ZB, présentent des profils métaboliques différents. Ces différences peuvent être liées notamment à l'âge du biofilm qui n'est pas contrôlé dans le milieu naturel.

Les biofilms épiphytiques (*Juncus effusus* et *Phalaris arundinacea*) sont de bons consommateurs de polymères, de carbohydrates, d'acides carboxyliques et azotés, ainsi que de composés phosphorés, dans certains cas des esters (AV baldingère et ZBjonc2). Les végétaux sont aussi susceptibles de relarguer certains composés notamment des sucres stimulant ainsi la croissance du biofilm sur les plantes (Amiaud et Benizri, 2005). Par conséquent, le métabolisme des microorganismes est alors adapté à l'utilisation des sucres. Cela pourrait expliquer les résultats obtenus au niveau des biotopes GN2 où les communautés bactériennes présentes consomment ces glucides. Les composés phosphorés comme le glucose-1-phosphate et le glucose-6-phosphate interviennent dans la glycolyse (métabolisme des sucres). Par conséquent, ces composés sont facilement assimilables au même titre que les sucres.

Afin de mieux discriminer les différents processus, une analyse en composante principale a été nécessaire.

IV.4.3.2/ Analyses des biolgs GN2 par ACP

Le tableau 24 représente la matrice des composantes des familles de substrats déterminée à partir des valeurs d'absorbances moyennes à 48h, pour chaque famille, avec les pourcentages de variances expliquées.

Tableau 24. Matrice des composantes établie à partir des familles de substrats

| Matrice des composantes après rotation ^a | | | | | |
|---|------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | Composantes (Variances expliquées) | | | | |
| | 1 (84,83 %) | 2 (8,45 %) | 3 (1,93 %) | 4 (1,38 %) | 5 (1,25 %) |
| Acides carboxyliques | ,891 | ,112 | ,027 | ,103 | ,026 |
| Composés azotés | ,827 | ,172 | ,212 | ,194 | ,272 |
| Amines | ,661 | -,166 | -,168 | ,322 | ,359 |
| Polymères | -,647 | -,403 | -,251 | ,467 | -,347 |
| Ester | ,214 | ,850 | -,232 | ,060 | -,055 |
| Carbohydrates | -,042 | ,760 | ,398 | ,127 | ,102 |
| Composés aromatiques | ,102 | ,014 | ,946 | ,029 | ,070 |
| Phosphorés | -,300 | -,210 | -,088 | -,911 | -,148 |
| Alcool | ,252 | ,030 | ,093 | ,098 | ,921 |

Le tableau 24 montre que les 2 premières composantes représentent 93,28 % de la variance expliquée cumulée. Les 2 premières composantes suffisent à expliquer la quasi-totalité des processus concernant la consommation des familles de substrats par les communautés. La première composante est marquée par les polymères (dans la partie négative), les amines et les composés azotés et les acides carboxyliques (dans la partie positive). Lorsque les composés de la partie positive sont consommés par les communautés, les polymères ne le sont pas. La composante 2 est marquée par les esters et les carbohydrates. La composante 3 est surtout marquée par les composés aromatiques, la composante 4 par les phosphorés et la composante 5 par les alcools. L'ACP montre que ces 3 dernières familles de substrats sont consommées indépendamment. Par conséquent, nous pouvons supposer que les processus métaboliques des communautés sont différents.

Seules les 2 premières composantes sont représentées car elles expliquent ainsi la quasi-totalité de la variance. La Figure 94 représente le diagramme de projection des variables et la Figure 94 représente le diagramme de projection des individus 24h, 48h et 72h.

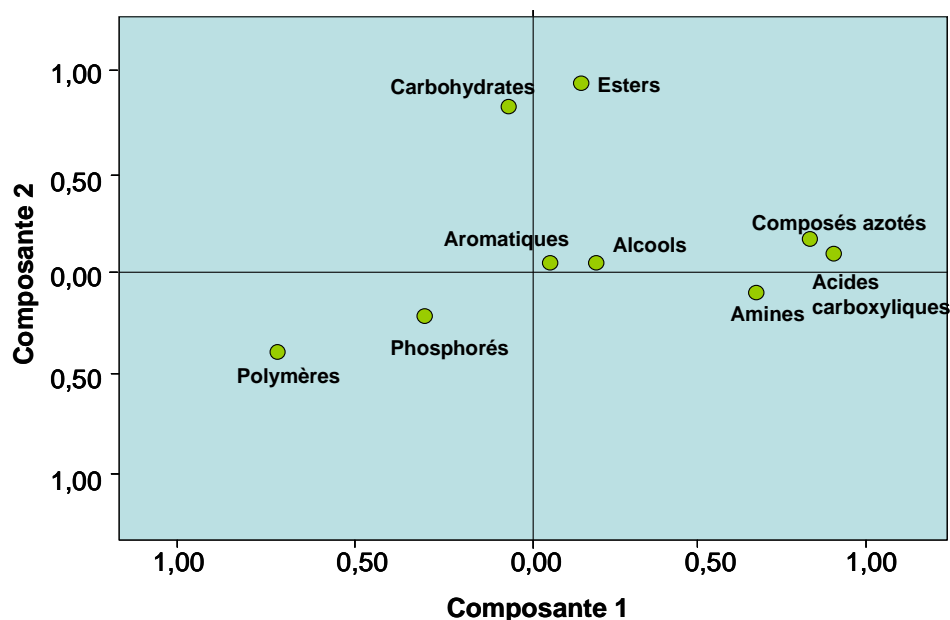
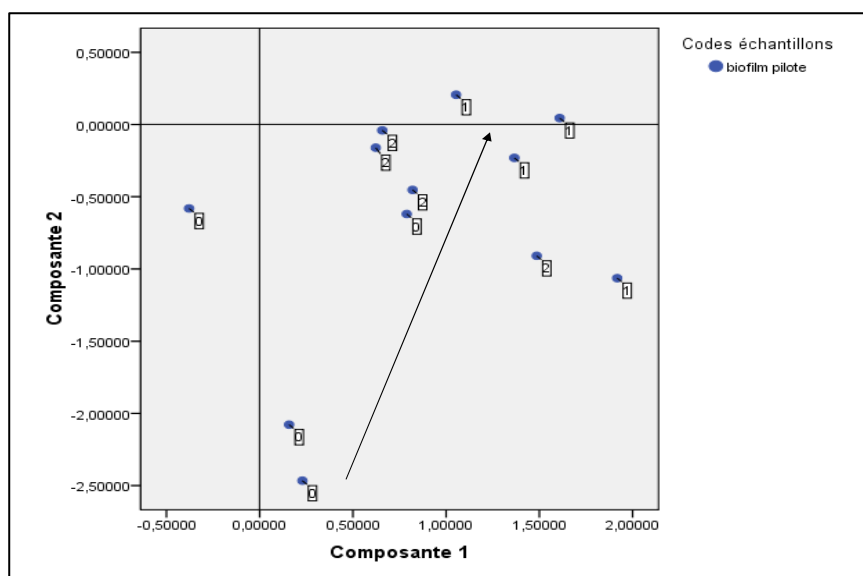
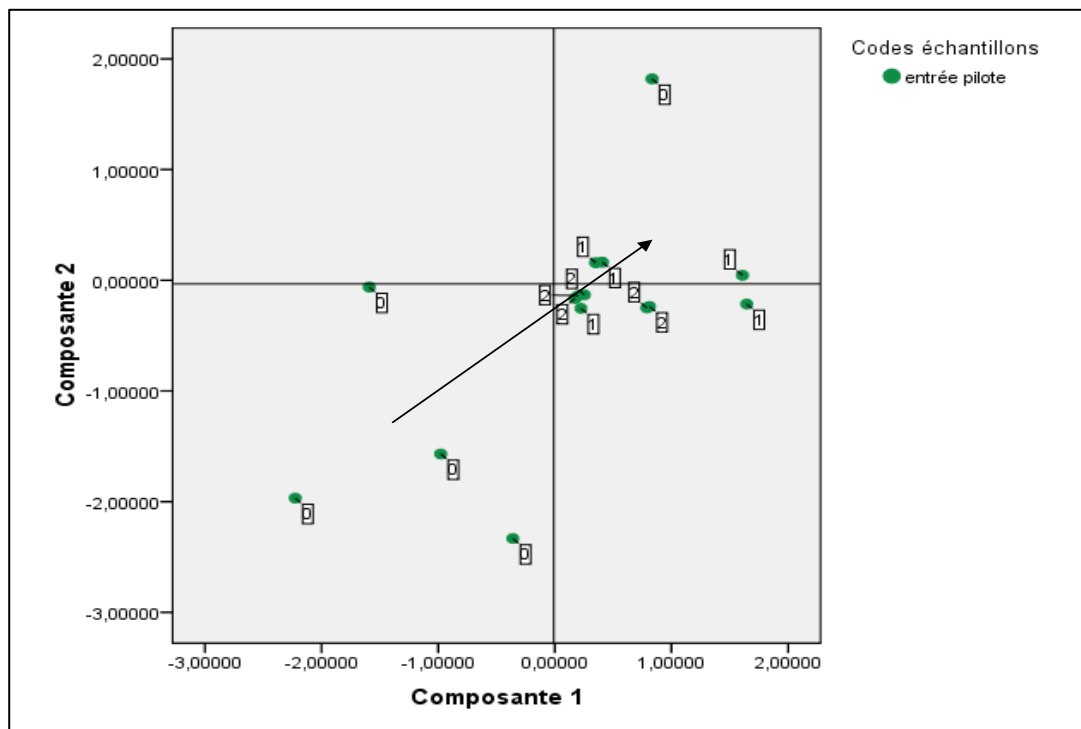


Figure 94 : Diagramme de projection des variables représentant des familles de substrats consommés

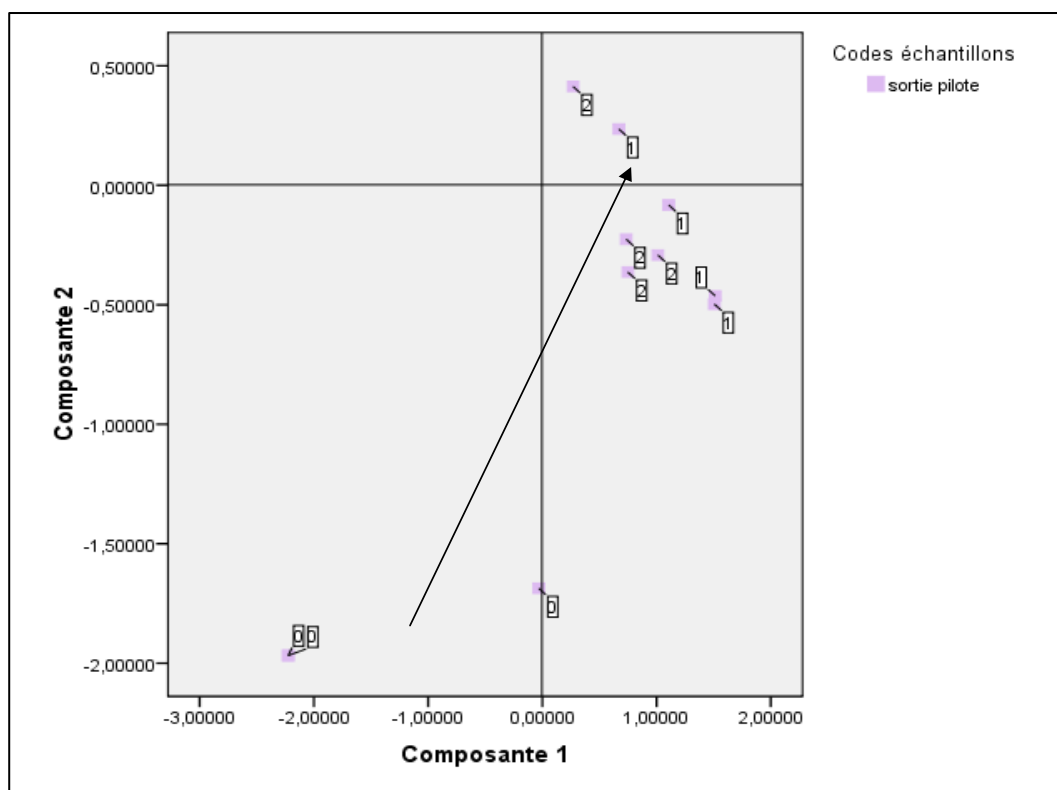
La Figure 94 bis (a,b,c,d,e,f) met en évidence une ACP réalisée avec les biologists qui ont montré l'influence du temps d'incubation sur les substrats consommés pour tous les échantillons étudiés (biofilms pilotes et épiphytiques et eaux été, hiver). Le code 0 représente 24h d'incubation, le code 1, 48 h et le code 2, 72 h.



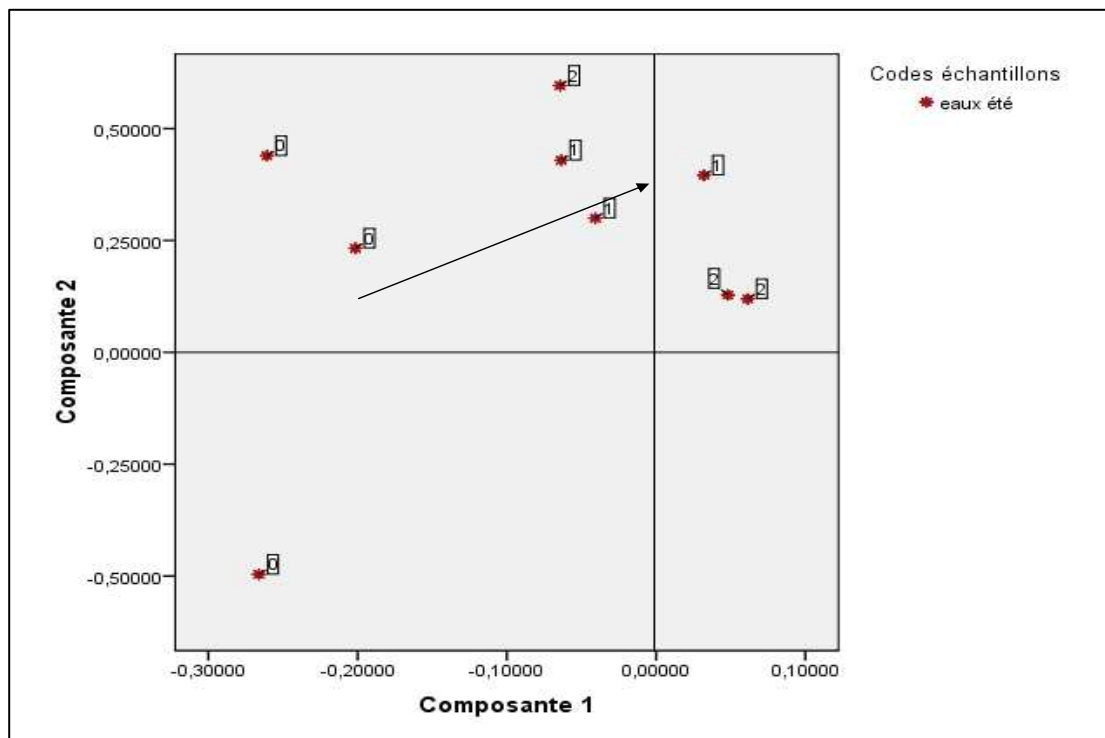
a/ Biofilms pilotes



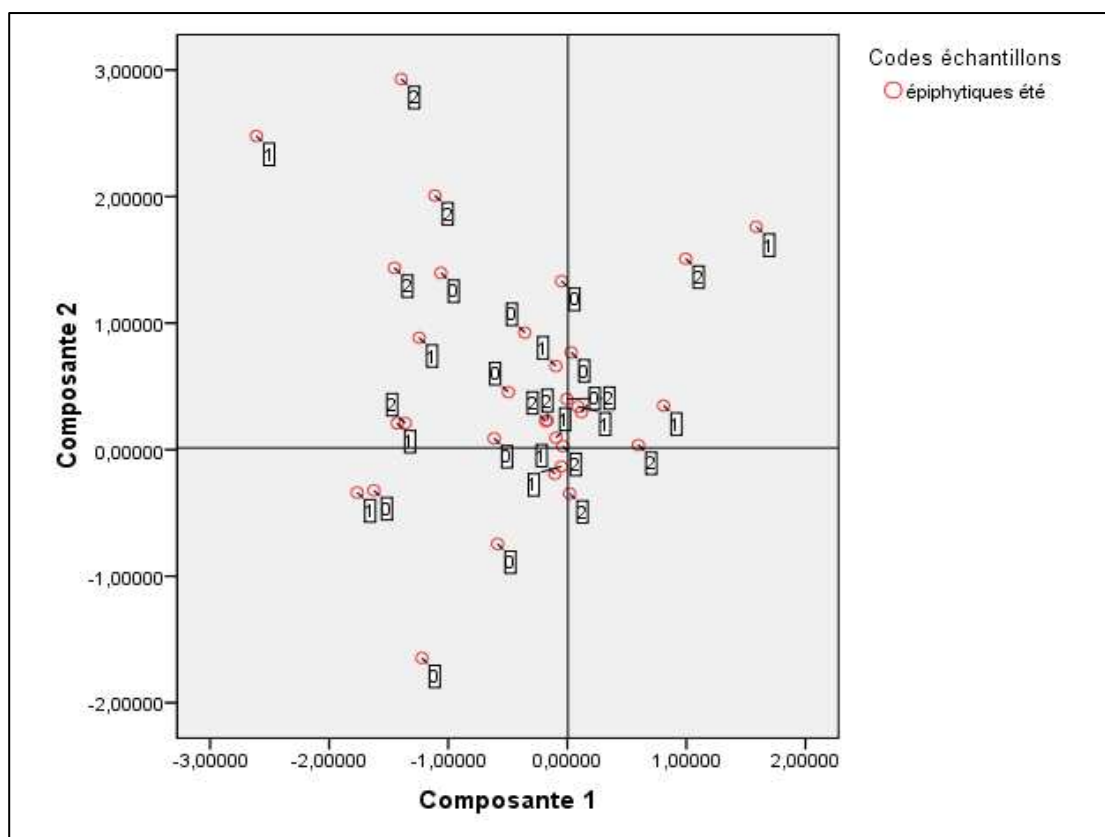
b /Eaux d'entrées ou d'alimentations du pilote (les eaux ont été prélevées en période hivernale)



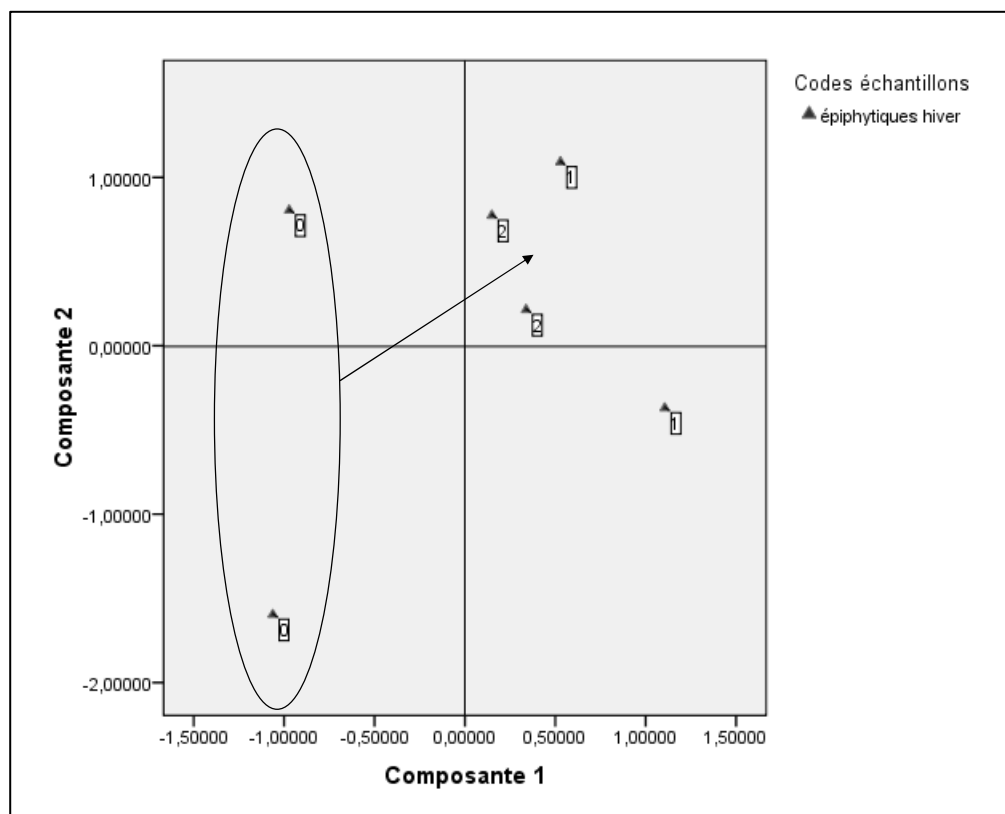
c/ Eaux de sortie du bioréacteur



d/ Eaux d'été



e/ Biofilms épiphytiques été (*Joncus effusus* et *Phalaris arundinacea*)



f/ Biofilms épiphytiques hiver

Figure 94 bi: Projection des individus (eaux, biofilms) dans le plan pour 24h (noté 0), 48h (noté 1) et 72h (noté 2) d'incubation

La Figure 94bis montre que les points se déplacent vers la droite du plan au fur et à mesure que le temps d'incubation augmente avec des différences observées qui sont généralement nettes entre 24h et 48h et moins marquées entre 48h et 72h. Les points correspondants aux biofilms élaborés en pilote et aux eaux d'entrées se déplacent vers la composante 1, alors que les eaux d'été se déplacent vers la composante 2. Cela montre que les familles de substrats, utilisées par les communautés, sont différentes selon les saisons (Figure 94bis, eaux hiver et été). Les biofilms élaborés en pilote, les eaux d'entrées et de sorties (après 48h et 72h d'incubation) sont plutôt marquées par la composante 1 dans sa partie positive. Par conséquent, les communautés présentes consomment majoritairement les composés azotés, les amines et les acides carboxyliques. Les biofilms épiphytiques, les eaux d'été et les biofilms prélevés en hiver sont plutôt représentés sur la composante 2. En effet, ces derniers sont marqués par la consommation des substrats appartenant à la famille des esters et des carbohydrates. Les communautés sont plus favorables à la consommation des carbohydrates en été qu'en hiver. De plus, au sein des biofilms épiphytiques, aussi bien l'hiver que l'été, les

communautés semblent consommer majoritairement les carbohydrates ce qui est probablement lié aux exudats de végétaux à base de glucides favorables à la croissance des communautés consommant ces familles.

Synthèse des résultats par approche multidimensionnelle

Comme pour les eaux, l'approche multidimensionnelle sur les biofilms a permis de mettre en valeurs certaines corrélations difficilement visibles sur l'étude des données séparées. Les résultats traités par analyse multifactorielle ont été divisés en 2 parties. En effet, une partie traite de toutes les corrélations avec les minéraux et l'autre partie traite des corrélations avec la MO. Dans les deux cas, les 2 premières composantes expliquent plus de 75 % de la variance. Le tableau 25 représente la matrice à 2 composantes après rotation. Les composantes 1 et 2 expliquent respectivement 71,055 % et 20,894 % de la variance. Les valeurs contenues dans ce tableau ont permis de réaliser les diagrammes de la Figure 95.

Tableau 25: Matrice des composantes établie à partir des paramètres physico-chimiques

| Matrice des composantes après rotation | | |
|--|-------------|------------|
| | Composantes | |
| | 1(71,055%) | 2(20,894%) |
| K | ,948 | ,307 |
| Si | ,960 | ,221 |
| Al | ,972 | ,150 |
| Epaisseurs | ,965 | ,189 |
| Mg | ,949 | ,305 |
| Ca | ,968 | ,203 |
| P | ,808 | ,376 |
| Fe | ,991 | ,022 |
| Na | -,671 | -,521 |
| COT | ,443 | ,875 |
| Population totale | ,510 | ,687 |
| Nt | ,362 | ,785 |
| Mn | ,107 | -,951 |
| Zn | ,041 | ,985 |

La Figure 95 représente un diagramme à 2 composantes (1 et 2) où sont projetés les variables (a) et les individus (b).

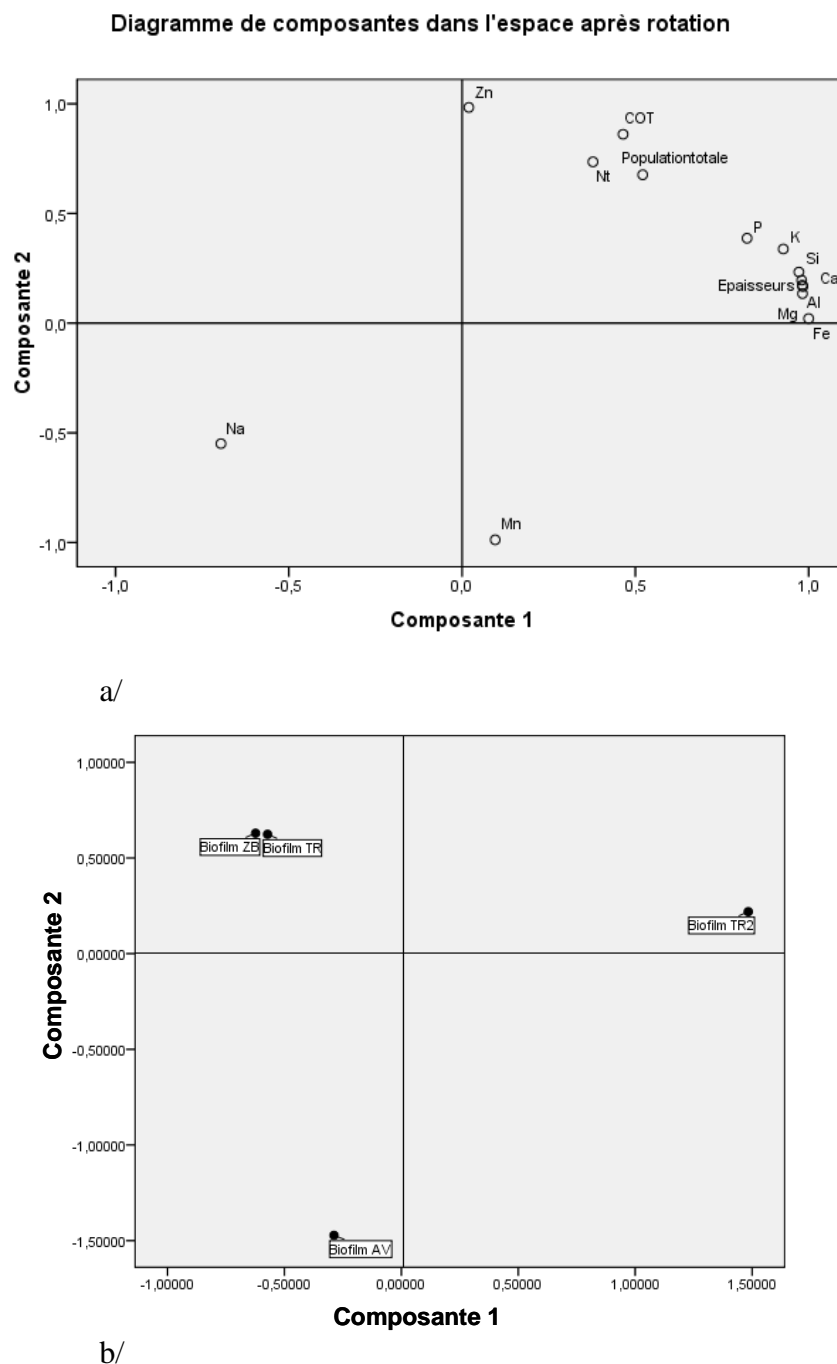


Figure 95 : Diagramme représentant la projection des individus (biofilms) dans le plan

Comme l'indique le tableau 24 et la Figure 95, la composante 1 décrit les éléments chimiques (K, Si, Al, Mg, Ca, P, Fe) et les épaisseurs de biofilm dans sa partie positive et le Na dans sa partie négative. Les épaisseurs vont dépendre de plusieurs paramètres notamment

de la présence de certains minéraux contenus dans le biofilm comme le Si, l'Al, le Fe, le Ca, le P et le K. De plus, lorsque le biofilm s'enrichi en minéraux, il semblerait que le Na ait moins d'affinité à s'incorporer dans ce dernier. La composante 2 décrit le Zn dans sa partie positive et le Mn dans sa partie négative. Le COT, l'azote total, la population bactérienne se situent sur les 2 composantes.

La Figure 95 montre une grande dispersion des biofilms selon leurs caractéristiques. En effet, le biofilm TR2 représenté sur la composante 1 dans la partie positive est plus marqué par l'épaisseur et les teneurs en Si, Al, Ca, Fe, Mg, et K avec des coefficients de corrélation respectivement de 0,997 ; 0,992 ; 0,998 ; 0,935 ; 0,954 et légèrement moins bien corrélé aux P (R^2 : 0,839) et inversement corrélé avec le Na (R^2 : -0,817). Aucune corrélation n'a cependant été observée entre l'épaisseur, le Mn et le Zn. Ces éléments sont plutôt représentés par la composante 2 comme le biofilm AV. Les biofilms TR et ZB sont assez proches et intermédiaires entre la composante 1 (partie négative) et 2 (partie positive).

Dans le chapitre III, les analyses de surface ont montré que le Mn est présent surtout sur les premières couches des biofilms (en présence de bactéries). Il n'apparaît plus en présence de diatomées. Ces taxons, constitués de Si, ont une taille importante ce qui explique certainement les corrélations entre le Si et les épaisseurs obtenues lors de cette étude et l'absence de corrélation avec le Mn lorsque le biofilm devient plus épais.

Dans un second temps, nous avons étudié les biofilms associés aux fragments de pyrolyses.

Le tableau 26 indique les 2 premières composantes qui expliquent 87,48 % de la variance.

Tableau 26 : Matrice des composantes établie à partir des paramètres organiques

| Matrice des composantes | | |
|-------------------------|--------------|--------------|
| | Composantes | |
| | 1(51,463%) | 2(36,018%) |
| Algues | ,983 | -,132 |
| Diatomées | -,970 | ,037 |
| 2EH | -,922 | -,385 |
| Population totale | ,897 | ,377 |
| 9octaD | ,853 | -,143 |
| 3 acetaF | -,701 | -,669 |
| Ac hex | ,070 | ,975 |
| hexad | ,289 | -,882 |
| COT | ,343 | ,877 |
| Indole | ,183 | -,841 |
| Cyanobactéries | -,644 | ,740 |
| Epaisseurs | ,483 | ,715 |
| 5MFC | ,411 | ,704 |

Le tableau 26 montre que sur la première composante, sont représentés les algues, le fragment 9 octaD et la population totale dans la partie positive et les cyanobactéries, les diatomées, les fragments 2EH et le 3 acetaF dans la partie négative. Sur la composante 2, sont représentés les fragments 3 acetaF, hexad et indole dans la partie négative et les fragments Ac hex, 5MFC, les épaisseurs, les cyanobactéries et le COT dans la partie positive. Nous remarquerons que les cyanobactéries sont présentes sur les 2 composantes (partie négative sur la composante 1 et positive sur la composante 2).

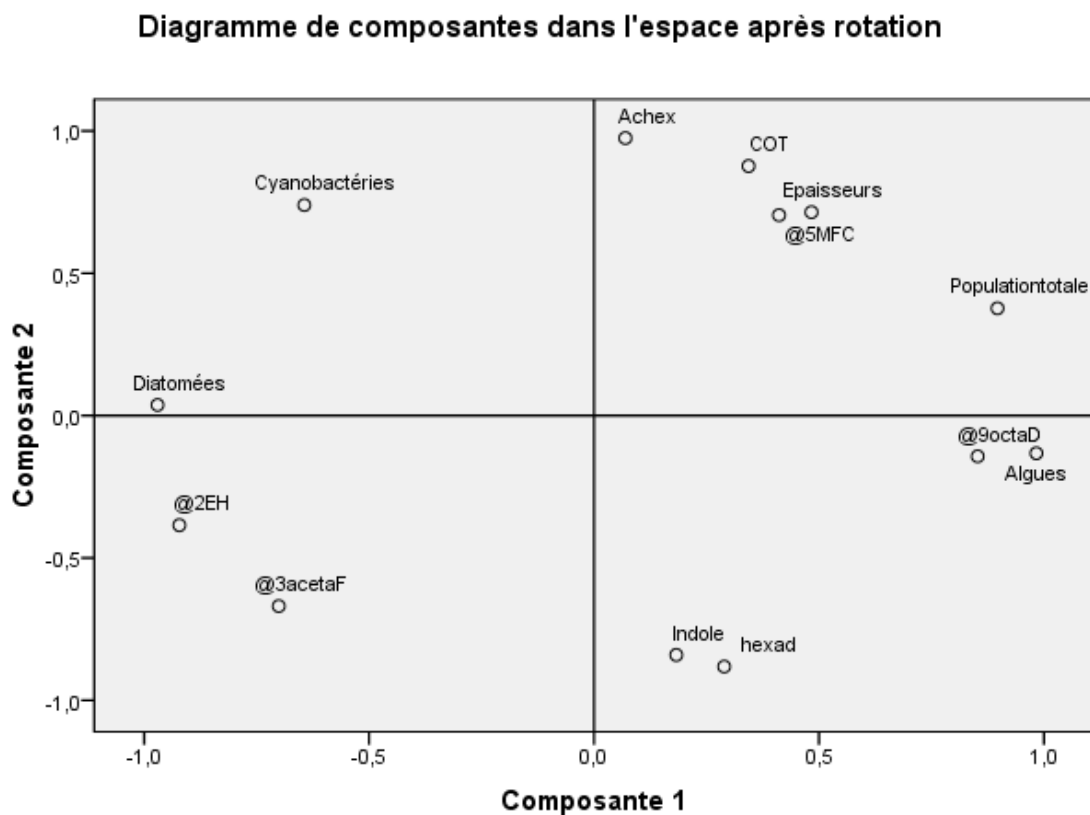


Figure 96: Diagramme de projection des variables dans le plan caractérisant la MO

Le COT et le 5MCF (produit de dégradation des sucres) sont très proches de l'épaisseur. Les résultats montrent qu'un biofilm épais est plus marqué par les sous produits de polysaccharides et du COT. L'indole et l'hexadecanamide qui sont très bien corrélés sur la composante 2, dans la partie négative, constituent respectivement des produits de dégradation des protéines et d'aminosucres.

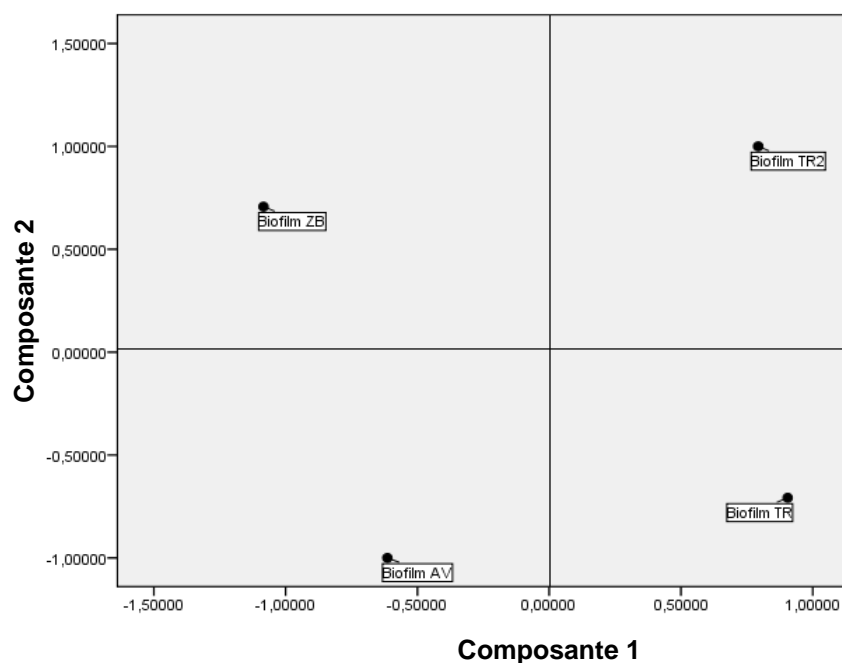


Figure 97: Diagramme de projection des biofilms dans le plan

Le biofilm ZB est marqué par les cyanobactéries, le biofilm AV, par les fragments attribués à l'activité biologique, le biofilm TR est marqué par les algues et le fragment 9 octadecenamides (origine bactérienne) et le biofilm TR2 est marqué par l'épaisseur, le COT, la population bactérienne totale. Nous remarquerons que la population totale est plus proche du fragment 9 octaD : un fragment caractéristique de l'activité microbienne. Il apparaît que les biofilms sont tous distincts et ont des caractéristiques très différentes, même sur des biofilms élaborés à partir d'eaux issus d'une même station, après 1 mois et demi d'intervalles (TR et TR2). Notre étude a alors montré une spécificité des biofilms selon les eaux étudiées.

CHAPITRE V : ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

Ce chapitre porte sur l'élargissement de l'étude des interactions entre les végétaux et les biofilms à l'échelle du BV du Trézon. Cette approche est très importante car la pollution émane du bassin versant du Trézon (BV) au niveau duquel la rivière du Trézon traverse des zones agricoles associant culture et élevages de bovins. Cette dernière capte des polluants avant de se jeter directement dans le lac de Ribou. Il est alors important d'agir également à l'échelle de bassin versant pour limiter les apports de polluants dans le réseau hydrographique. Nous avons préalablement mis en évidence les capacités d'un biofilm âgé d'une dizaine de jours à influencer la composition de l'eau notamment par certaines potentialités épuratoires (transformation de la MO, rétention du P et de certains métaux comme le Fer et le Mn). **De plus, nous avons montré que les biofilms étaient différents selon les eaux étudiées. Nous supposons alors qu'à l'échelle du BV, les biofilms auront également leurs propres caractéristiques.** Dans cette continuité, les travaux à l'échelle du Bassin Versant ont pour objectif de mettre en évidence la composition des biofilms épiphytiques dans le but de les caractériser (composition biologique et chimique) pour apporter une nouvelle méthodologie de diagnostic au niveau du BV et pour confirmer que ces derniers sont capables de capter certains polluants (métaux, phosphore).

V.1/ DIAGNOSTIC A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT

V.1.1/ Etude des communautés dans l'eau et au sein des biofilms

Les Figures 98 et 99 mettent en évidence l'abondance relative entre les algues, les diatomées et les cyanobactéries dans les eaux du Bassin Versant et sur les biofilms épiphytiques correspondant, au cours du temps.

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

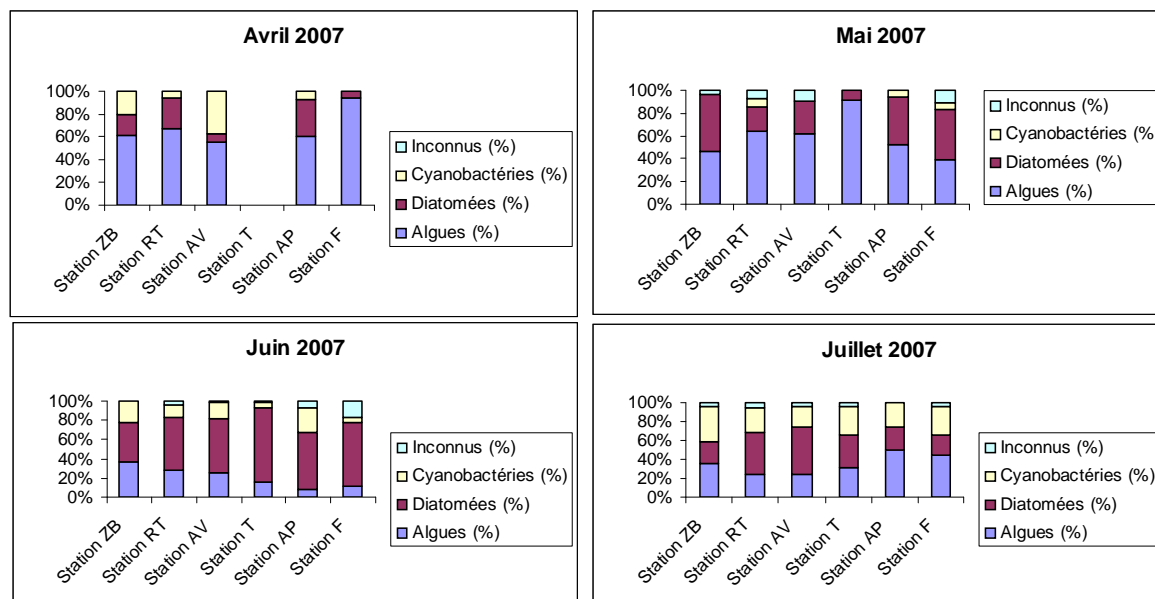


Figure 98: Composition des eaux du BV selon les campagnes de prélèvement

La Figure 98 montre des différences observées entre les stations étudiées et au cours du temps dans les eaux du BV. De plus, les stations ZB et AV sont particulièrement marquées par les cyanobactéries dès le début du printemps. Ces dernières représentent des proportions assez importantes par rapport aux diatomées et aux algues. Ces résultats montrent bien que les stations ZB et AV sont sensibles au développement des cyanobactéries. Par la suite, elles sont présentes au niveau des eaux de toutes les stations (Juillet 2007). Ces dernières se développent dans les eaux lorsque celles-ci se réchauffent. La Figure 99 montre l'abondance relative à différentes périodes de l'année, entre les algues, les diatomées et les cyanobactéries dans les biofilms épiphytiques issus des stations du BV.

CHAPITRE V : ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

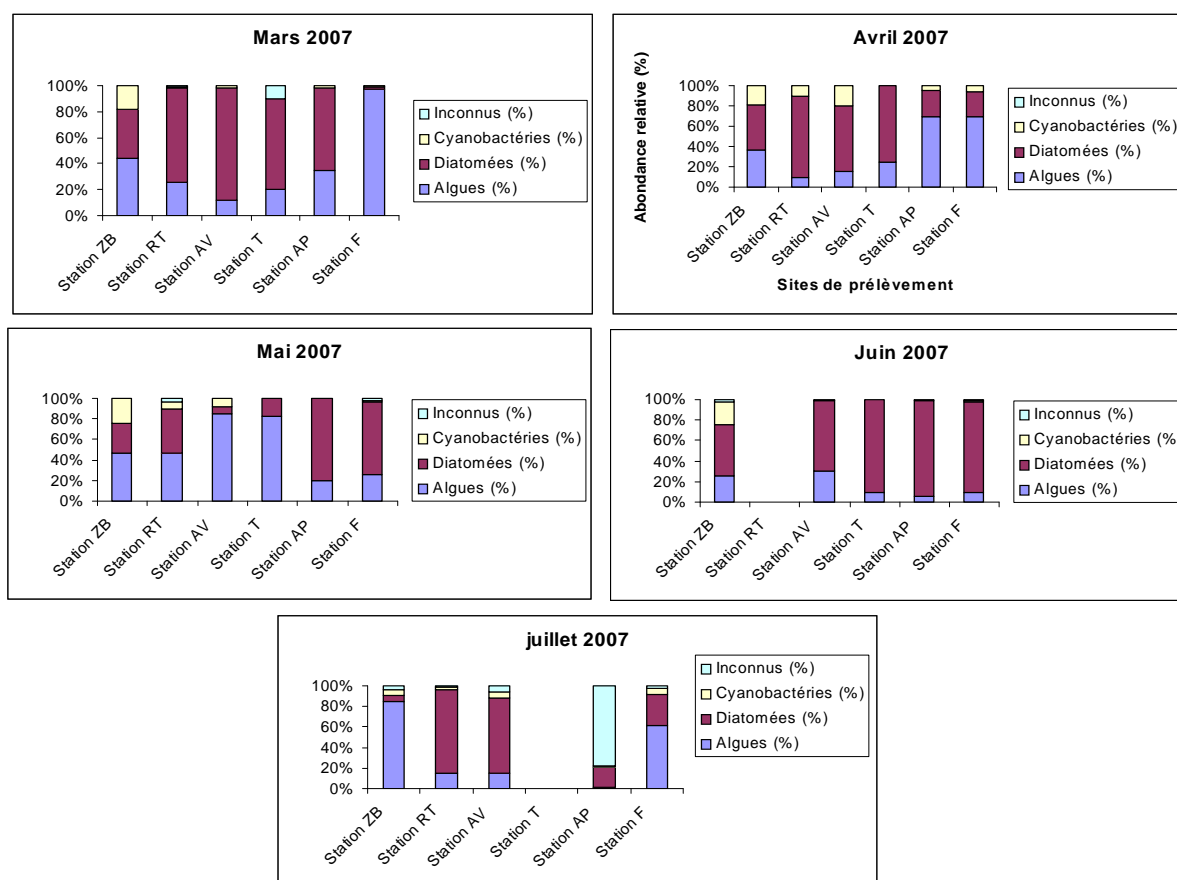


Figure 99 : Composition des biofilms selon les campagnes de prélèvements (précision : $\pm 5\%$)

Selon les périodes de l'année, les cyanobactéries sont présentes dans les biofilms épiphytiques issus des stations ZB et aussi AV à l'exception des prélèvements de juillet 2007 où les cyanobactéries sont peu présentes dans les biofilms. Ces résultats tendent à montrer que lorsque ces dernières se développent dans les eaux et lorsque les conditions deviennent favorables, elles auraient moins d'affinités à s'attacher sur les supports végétaux. Les biofilms révèlent que les stations ZB et AV sont plus propices au développement précoce des cyanobactéries par rapport aux autres stations. Ces résultats sont confirmés avec les analyses d'eau bien que l'on observe des différences au niveau des proportions entre les taxons contenus dans les biofilms et dans l'eau.

La Figure 100 présente des illustrations très diversifiées de biofilms épiphytiques issues du Bassin Versant de Ribou obtenues par MEB durant la campagne de prélèvement de mars 2007.

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

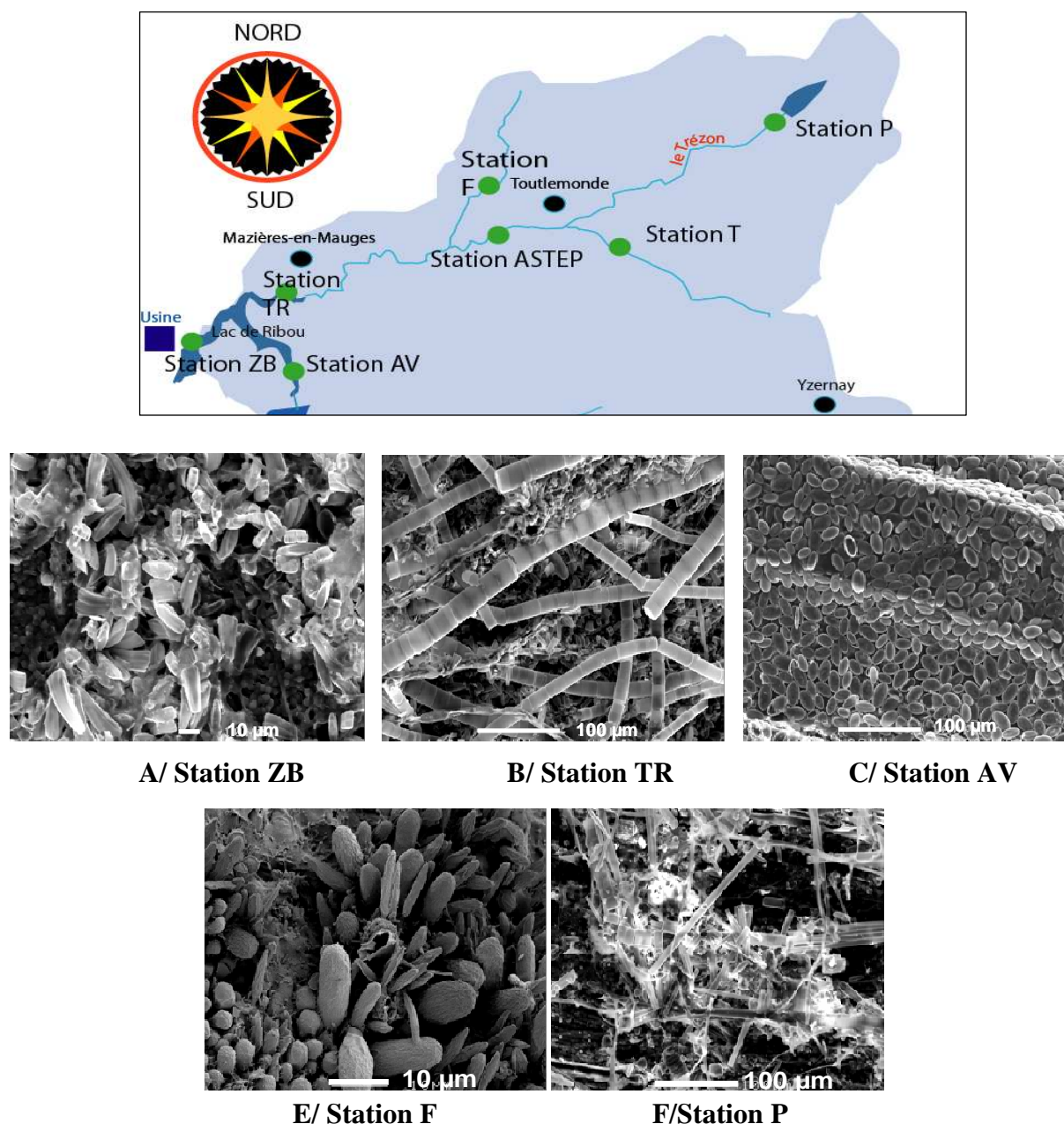


Figure 100 : Biofilms épiphytiques (*Phalaris arundinacea*) issus de différentes stations au niveau du BV du Trézon

La population des taxons au sein des biofilms est très variable selon la station de prélèvement. En effet, au niveau de la station ZB, nous avons remarqué une nette prédominance du genre *Gomphonema sp.* et *Rhoicosphenia abbreviata*, alors qu'au niveau de la station TR, de nombreuses diatomées filamenteuses sont présentes au sein du biofilm avec l'espèce *Melosira varians* qui traduit un enrichissement organique de l'eau. D'autres diatomées sont également présentes comme les genres *Cocconeis sp.*, *Synedra sp.*,

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

Gomphonema sp. Sur la station AV, les diatomées du genre *Cocconeis sp.* sont très majoritaires au niveau du biofilm à près de 99 %. Sur les autres points de prélèvements, les biofilms observés sont aussi différents avec la station F qui se distinguent plus particulièrement par une prédominance algale (Chlorophycées, Euglènes...). Tous ces biofilms apparaissant très différents selon les stations étudiées, pourraient traduire une certaine qualité d'eau. Comme précédemment, une étude sur des supports bambous a été réalisée pour suivre la colonisation des supports durant le temps d'immersion.

Les Figures 101 et 102 illustrent des biofilms se développant sur supports bambous installés au niveau de la station T et d'une station située en aval de STEP (station ASTEP).

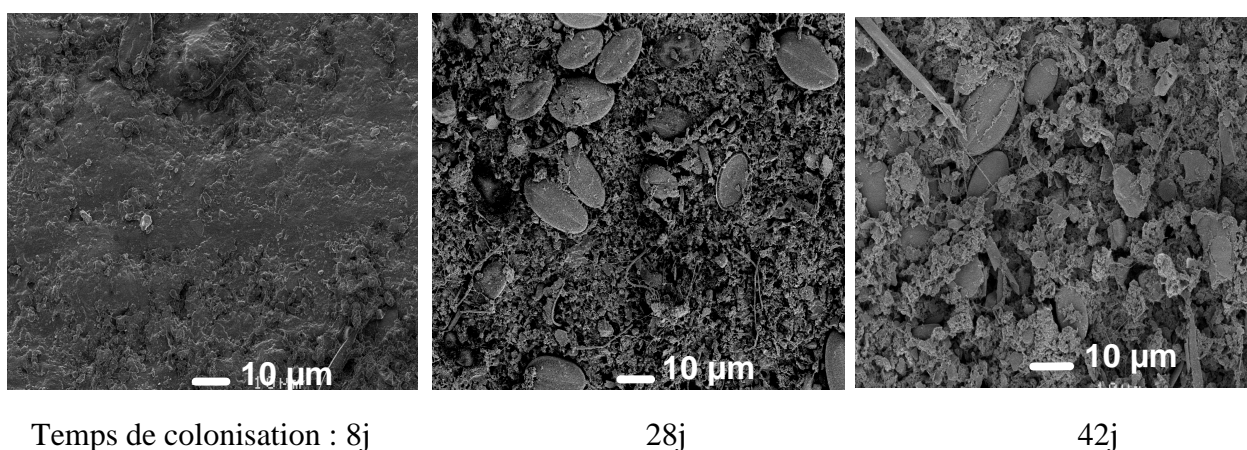
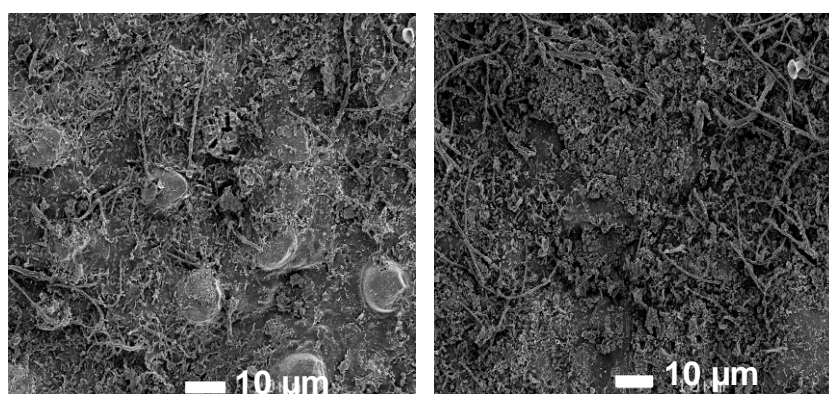
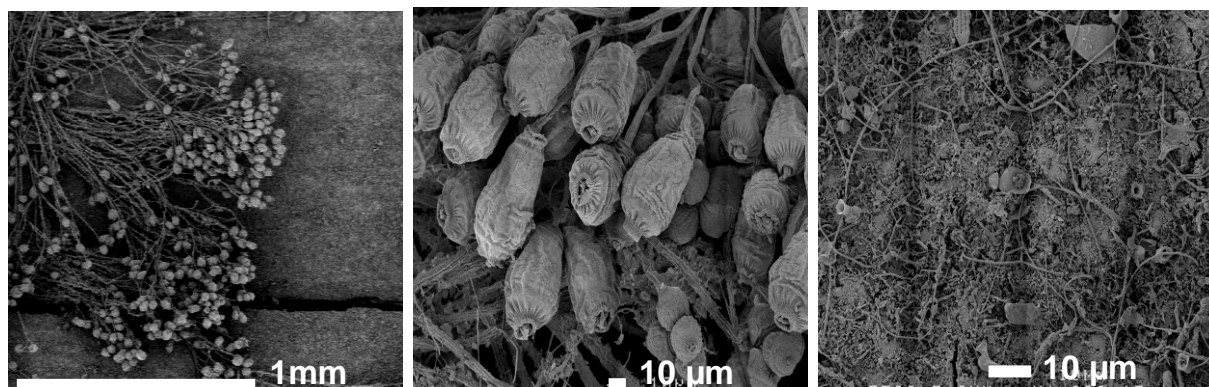


Figure 101 : Illustration de la surface de bambous colonisés au niveau de la station T.



A/ Temps de colonisation : 8 jours

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE



B/ Temps de colonisation : 28 jours

Figure 102 : Illustration de la surface de bambous colonisés au niveau de la station ASTEP.

Les Figures 101 et 102 montrent qu'après 8 jours de colonisation, un début de formation de biofilms apparaît sur les supports bambous. Après 28 jours de colonisation, les biofilms se sont très développés au niveau des 2 stations et sont très différents. En effet, au niveau de la station T, les biofilms sont constitués essentiellement du genre *Cocconeis sp.* visible sur ces clichés MEB (Figure 101). Néanmoins, il est à noter que la densité de ces microorganismes photosynthétiques est faible par rapport aux biofilms observés sur d'autres stations (chapitre III). Cette station étant ombragée, la faible pénétration de la lumière pourrait jouer un rôle en limitant la photosynthèse et par conséquent le développement accru des algues et des diatomées. En ce qui concerne la station ASTEP, de nombreuses colonies de protozoaires flagellées sont observées et prédominent dans ce biofilm. Ces organismes sont rencontrés dans les eaux usées. La présence de ces organismes sous forme d'amas pourrait être un indicateur d'une très mauvaise qualité d'eau. Ce point est en effet très eutrophisé avec des concentrations en P total atteignant **les 0,625 mg/L en Mai et 0,404 mg/L en Juin**. Les concentrations en MO sont proches de **10 mg/L**. Cette station est la plus eutrophisée du Bassin Versant du Trézon.

Tous les milieux sur lesquels ont été réalisés les prélèvements ont des caractéristiques différentes (physico-chimie, rivières (station F) ou retenue (station ZB), luminosité (la station ZB est très exposée à la lumière en revanche, la station T est située dans une zone plus ombragée). En accord avec tous ces paramètres, les biofilms observés sont très différents

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

selon les stations de prélèvement. Les biofilms semblent apparaître comme des marqueurs caractéristiques d'une eau étudiée. De plus, l'étude suivante a montré que la composition de l'eau et celle du biofilm pouvaient être très proche en considérant les grandes familles (en abondance relative entre diatomées, algues et cyanobactéries) et totalement différentes au niveau de la composition des espèces.

V.1.2/ Composition des espèces entre biofilm et eau issus d'un même site

La Figure 103 montre les proportions entre les différentes espèces qui sont retrouvées dans l'eau et dans le biofilm élaboré sur support bambou.

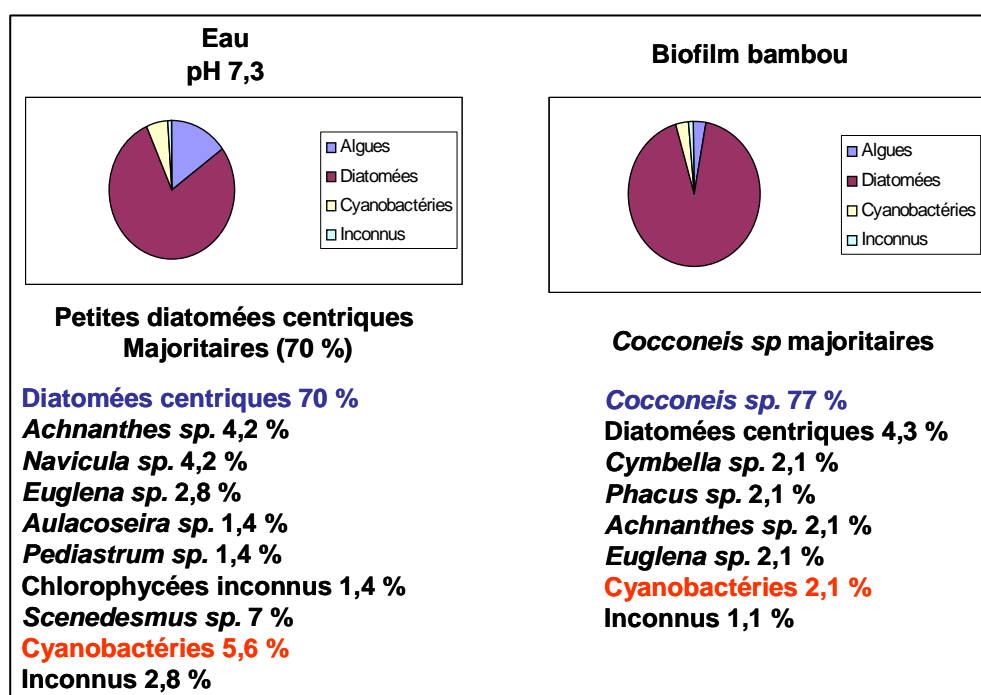


Figure 103 : Composition du phytoplancton dans l'eau et au niveau du biofilm (bambou)

La Figure 103 met en évidence la prédominance des diatomées dans l'eau et dans le biofilm. En effet, dans les deux cas, ces dernières représentent plus de 75 % par rapport à l'ensemble des taxons. En revanche, les espèces de diatomées prépondérantes dans les « deux milieux » sont différentes. En effet, le biofilm est composé à 77 % du genre *Cocconeis sp.* et les eaux sont majoritairement composées de diatomées centriques (70 %). Toutes les espèces

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

n'ont pas la même affinité avec le support. Ces résultats montrent bien que le biofilm est différent de la composition de l'eau par rapport aux espèces étudiées.

Les Figures 104 et 105 représentent des clichés photographiques de surface observés au MEB et elles illustrent parfaitement ces différences de composition entre le biofilm et l'eau. La Figure 104 montre des échantillons de bambous colonisés par les biofilms à deux profondeurs différentes. Ces clichés sont représentatifs de la surface considérée.

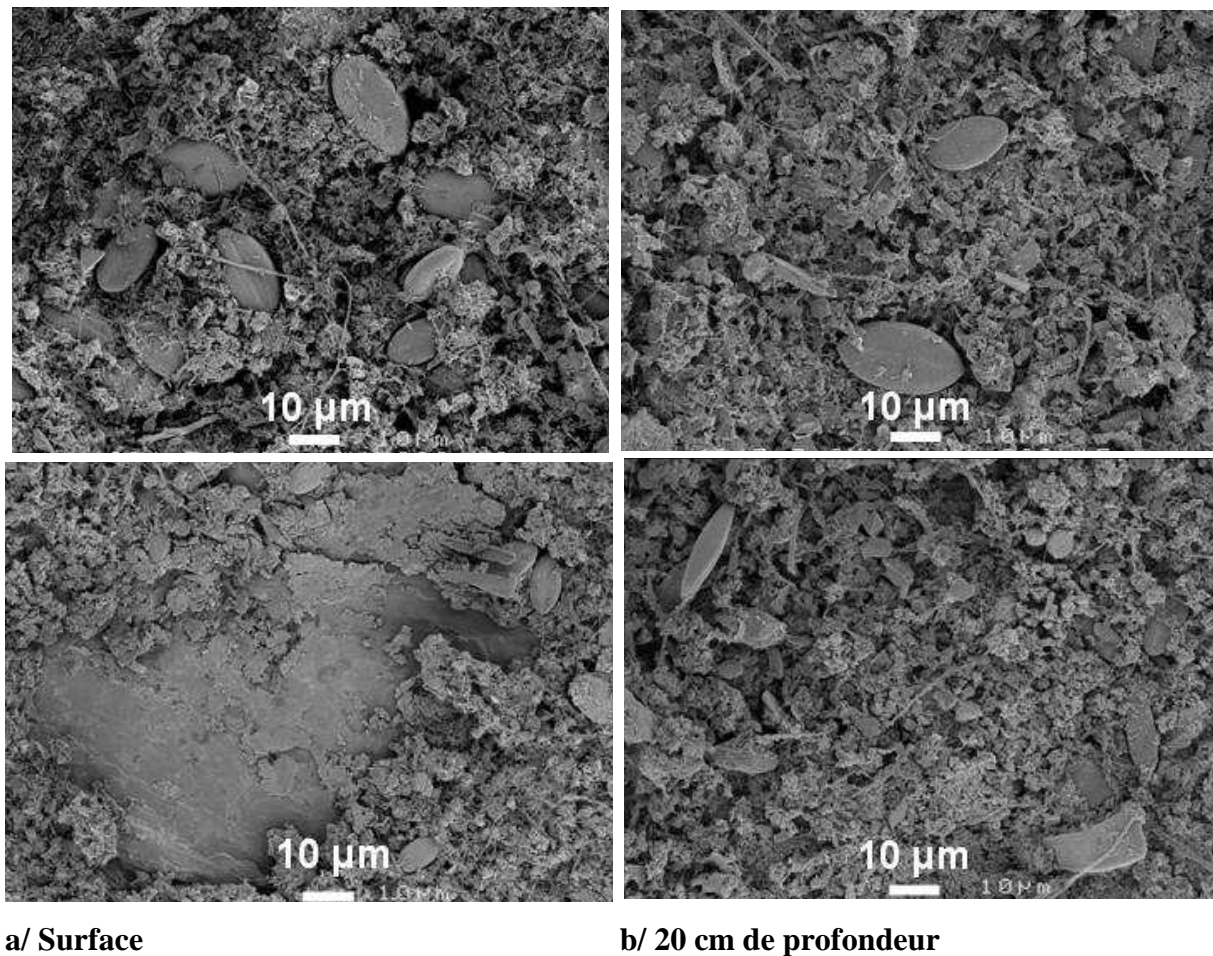


Figure 104 : Biofilm sur supports bambous (18 juin 2007)

Les résultats obtenus permettent d'affirmer que les diatomées sont présentes sur toute la hauteur du bambou. Les analyses d'eau ont montré que la composition en phytoplancton est beaucoup plus variée dans l'eau surtout en chlorophycées comme le montre les Figure 103 et 105. Sur la Figure 105, les résultats suivant sont obtenus par filtration de 100 ml sur membrane de diamètre de pores de 0,45 µm. Par conséquent, tous les microorganismes comme les bactéries et les algues sont retenues.

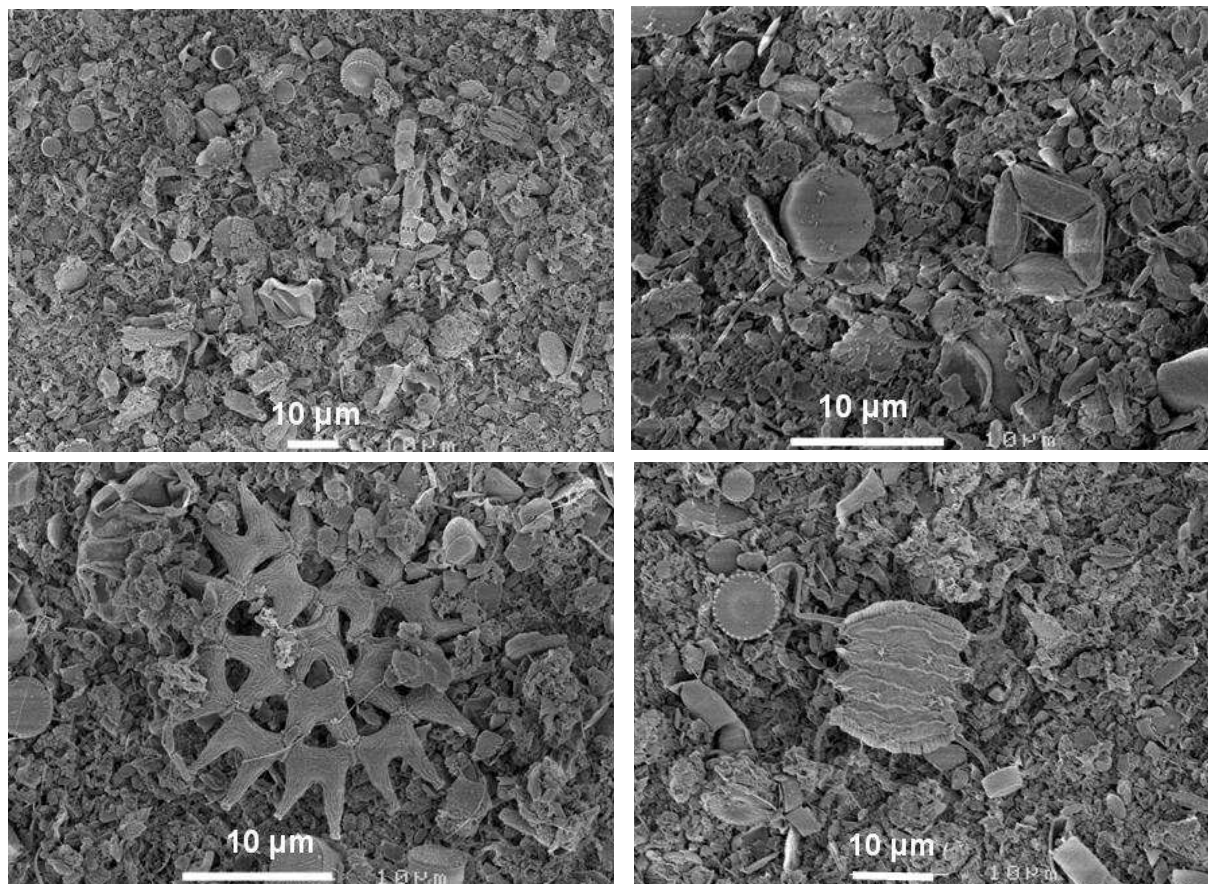


Figure 105 : Illustration obtenue par MEB de la composition de l'eau préalablement filtrée sur membrane (18 juin 2007).

Certains genres de chlorophycées comme les genres *Scenedesmus* sp. (Figure 105, en bas à droite), *Pediastrum* sp. (Figure 105, en bas à gauche) sont présents dans l'eau mais pas retrouvés dans les biofilms. Ces résultats obtenus ne signifient pas que ces espèces ne peuvent pas être retrouvées dans le biofilm. Cependant, il semblerait que ces microorganismes n'aient pas d'affinités avec ces supports dans les conditions physico-chimiques de ce milieu.

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

V.1.3/ Etude de la composition chimique

Les Figures 106 et 107 montre l'évolution de la composition en élément chimique du biofilm constitué sur supports bambous pendant la période du 7 Mai au 16 Juillet 2007.

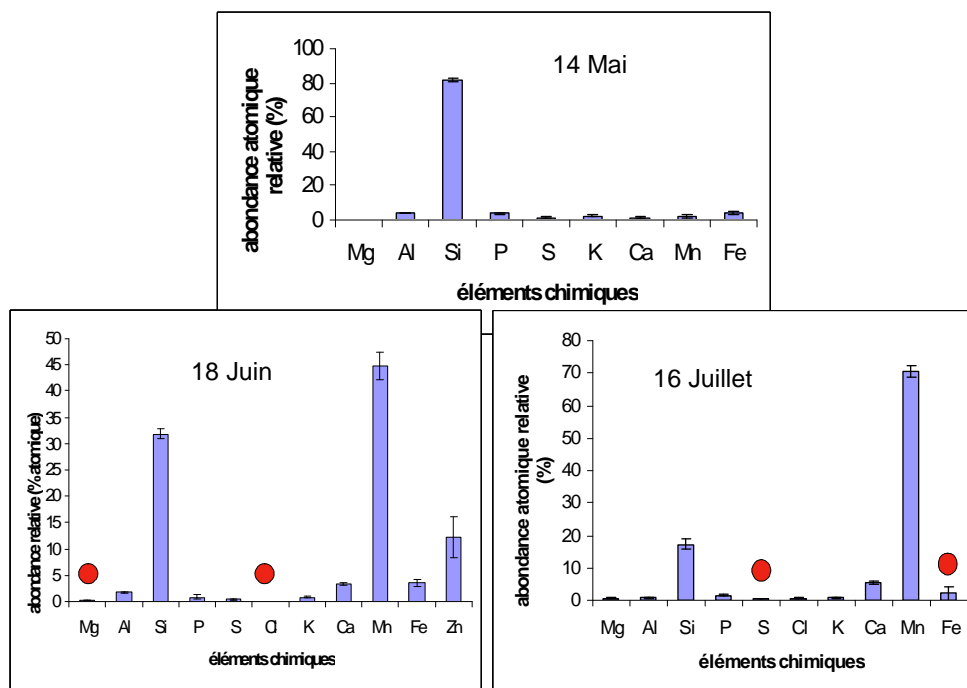


Figure 106: Suivi de la composition chimique au sein d'un biofilm sur bambous
(dans l'eau : en Mai, $[Fe] = 1,44 \text{ mg/L}$ soit $1,55 \cdot 10^{19}$ atomes, $[Mn] = 0,112 \text{ mg/L}$ soit $1,23 \cdot 10^{18}$ atomes. En juin, $[Fe] = 1,71 \text{ mg/L}$ soit $1,85 \cdot 10^{19}$ atomes, $[Mn] = 0,325 \text{ mg/L}$ soit $3,56 \cdot 10^{18}$ atomes. En juillet, absence de données. Les points rouges sur chaque histogramme montrent que les valeurs ne sont pas significatives)

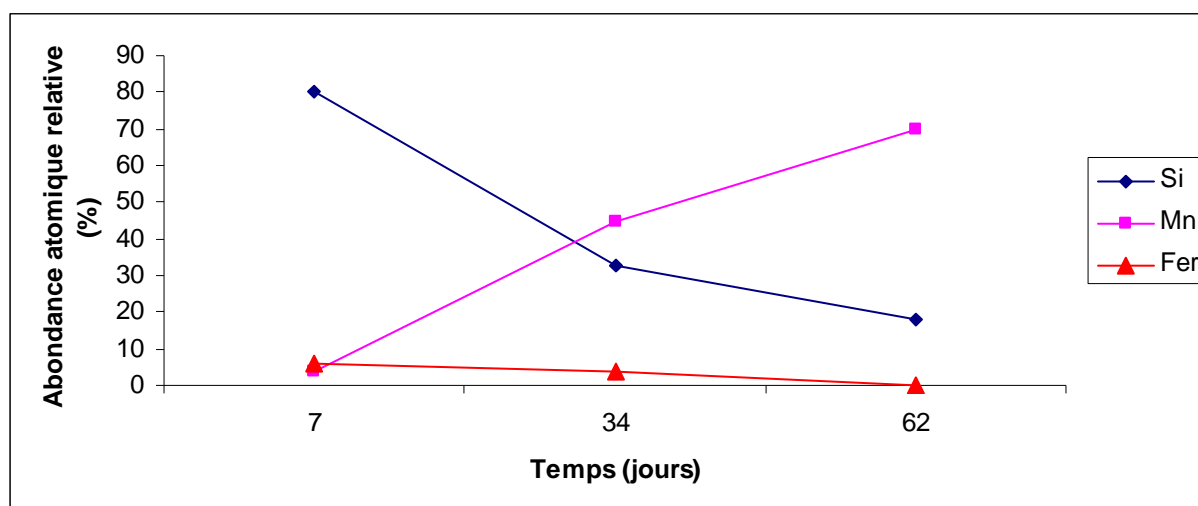


Figure 107: Evolution des proportions de Fer, de Mn et de Si au cours de l'élaboration d'un biofilm naturel (station T)

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

La Figure 106 montre que tous les éléments sont présents en faible abondance relative (< 5 %), après 7 jours de colonisation (14 mai), à l'exception du silicium qui est présent sur le support. Après 1 mois de colonisation, le Zn apparaît parmi les autres éléments déjà mis en évidence sur les biofilms des autres stations (chapitre III et IV). Lorsque le biofilm évolue, le manganèse devient l'élément prépondérant par rapport à tous les autres éléments chimiques (calcium, fer, aluminium...) alors que dans l'eau, les concentrations en fer sont 13 fois supérieures en Juin et 5 fois supérieures en Juillet. Cependant, les conditions du milieu sont propices à l'assimilation du manganèse par le biofilm qui devient très prépondérant après 62 jours de colonisation (Figures 106 et 107).

NB : Les autres éléments chimiques ne sont pas dosés dans l'eau.

L'ensemble de ces résultats a montré que selon les stations, les biofilms avaient leurs propres caractéristiques. Sachant que toutes les eaux étudiées ont elles-mêmes des paramètres physico-chimiques et biologiques différents, une étude par analyse par composante principale s'avère essentielle pour souligner les corrélations entre toutes ces variables et les caractéristiques de chaque station.

V.1.4/ Bilan Bassin Versant : synthèse des données obtenues par ACP

Dans ce paragraphe, La Figure 108 représente une ACP réalisée sur l'ensemble des données physico-chimiques et biologiques (eaux et biofilms) du bassin versant obtenue sur 4 mois d'étude et sur 6 stations de prélèvements (résultats de 27 analyses). Les variables et les stations sont représentées sur le diagramme constitué par les 2 premières composantes. Un code de couleur est attribué aux stations selon les campagnes de prélèvements comme le montre la Figure 108. Les variances expliquées des composantes 1 à 5 sont respectivement 23,309 %, 17,42 %, 15,11 %, 11,39 % 8,53 %. Nous représenterons uniquement les composantes 1 et 2.

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

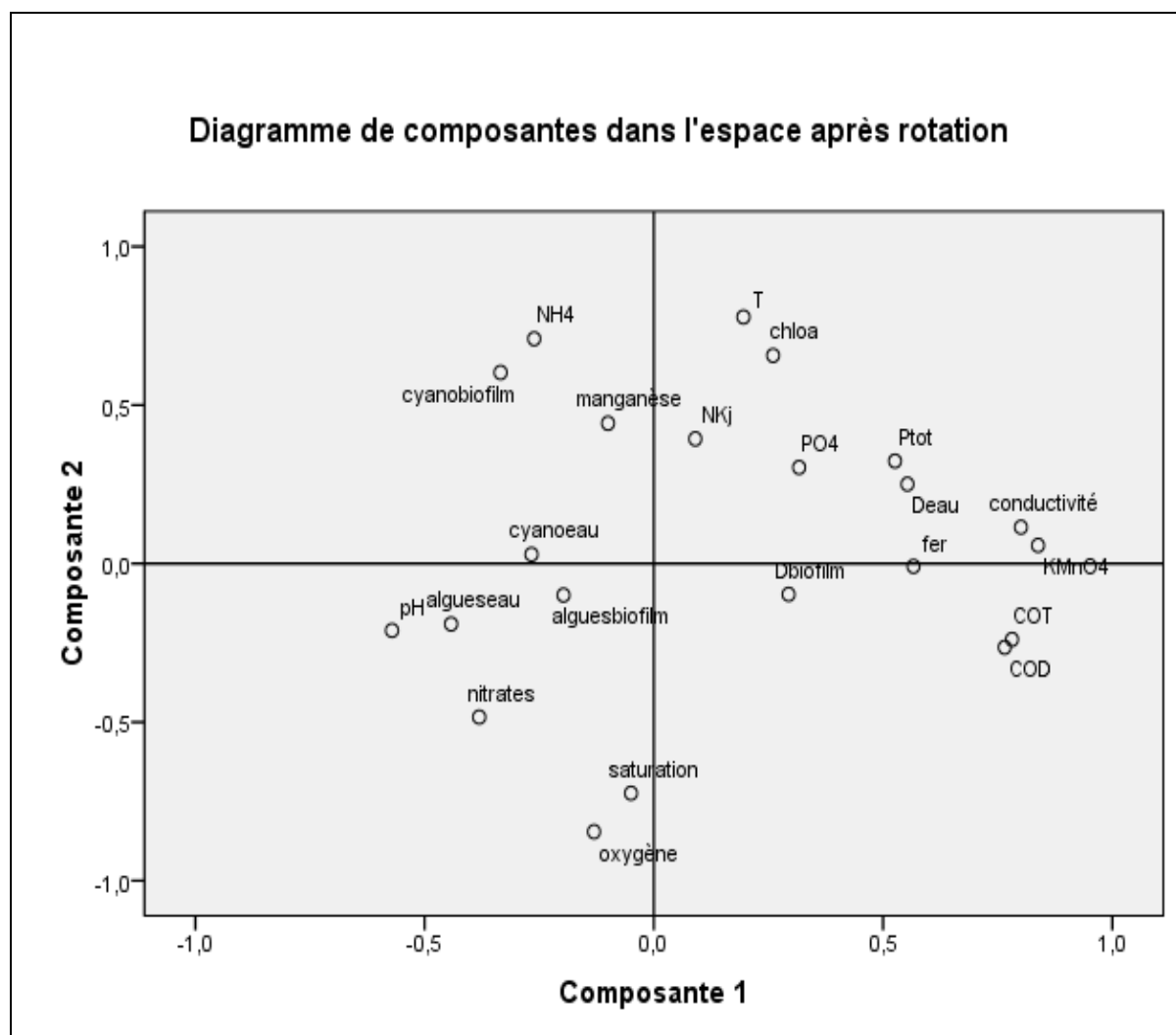


Figure 108 : Représentation des stations et des variables par ACP réalisée sur l'ensemble des données du Bassin Versant.

La composante 1 décrit dans sa partie positive, les apports organiques et minéraux, probablement d'origine anthropique et dans sa partie négative, le pH, ainsi que les algues (influence des processus d'eutrophisation sur le pH).

La composante 2 qui est construite à partir des variables T, NH_4^+ et dans une moindre mesure par NK_j , Mn, cyanobiofilm et chloa témoigne dans sa partie positive de la nature réductrice des eaux estivales. Cette composante qui est construite dans sa partie négative par des valeurs

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

élevées de l'oxygène correspondant à des températures plus basses des eaux, témoigne de l'impact saisonnier sur la qualité de ces eaux. On peut s'étonner de ne pas trouver la chlorophylle *a* avec les algues. Cependant, les résultats ont pu être erronés en utilisant les valeurs des proportions entre les algues, les cyanobactéries et les diatomées, surtout que tous ces taxons produisent de la chlorophylle *a*.

La Figure 109 montre l'évolution des eaux des différentes stations étudiées au cours des mois (de Mars à Juin 2007) qui sont projetés sur un diagramme à deux composantes.

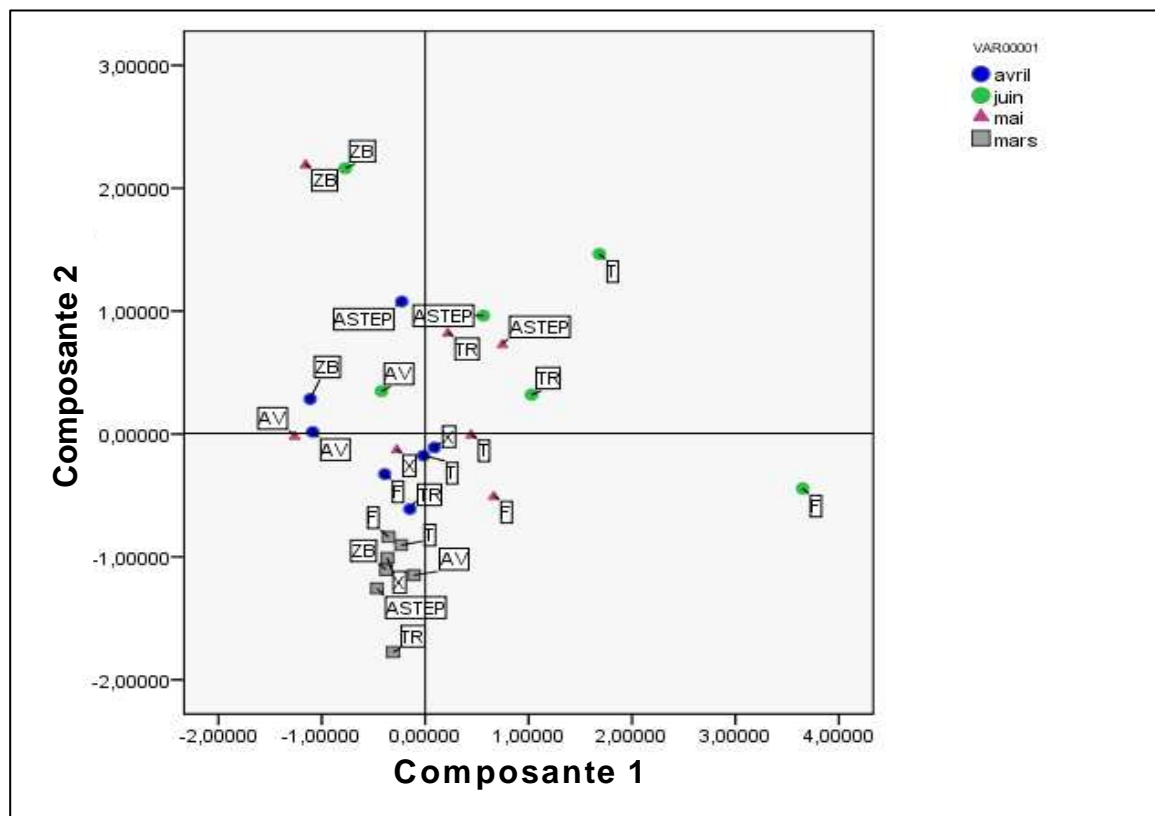


Figure 109: Diagramme à deux composantes représentant la projection des individus (stations de prélèvement situées sur le Bassin Versant) (Représentation des stations en noir : Mars ; en bleu : Avril ; en vert : Mai ; en rose : Juin)

Le tableau 27 montre les composantes entre les facteurs et les variables par rapport à tous les paramètres étudiés. 2 composantes traduisant ainsi des processus environnementaux bien distincts sont mises en évidence.

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

Tableau 27 : Matrice des composantes établie à partir des paramètres physico-chimiques et microbiologiques

| | Composante | |
|----------------|------------|-------|
| | 1 | 2 |
| KMnO4 | ,838 | ,057 |
| conductivité | ,801 | ,115 |
| COT | ,781 | -,239 |
| COD | ,765 | -,264 |
| pH | -,571 | -,211 |
| fer | ,566 | -,009 |
| D eau | ,553 | ,251 |
| Ptot | ,526 | ,324 |
| algues eau | -,442 | -,190 |
| PO4 | ,317 | ,303 |
| D biofilm | ,294 | -,097 |
| cyano eau | -,267 | ,029 |
| algues biofilm | -,197 | -,099 |
| oxygène | -,131 | -,846 |
| T | ,195 | ,778 |
| saturation | -,050 | -,724 |
| NH4 | -,261 | ,709 |
| chlo a | ,260 | ,657 |
| cyano biofilm | -,334 | ,603 |
| nitrites | -,381 | -,484 |
| manganèse | -,100 | ,443 |
| NKj | ,090 | ,394 |

La Figure 109 et le Tableau 27 montrent que selon les campagnes de prélèvements, l'évolution des processus environnementaux va dépendre des stations étudiées. En effet, les processus décrits au niveau de la station ZB tendent vers le développement des cyanobactéries dans les biofilms avec le réchauffement des eaux. La station AV est marquée surtout par un

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

développement algal et le pH. Les stations TR et ASTEP par le P, les phosphates. La station T est mieux représentée en positif par la composante 1 en juin qu'en mars et la station F s'oriente vers la composante organique (COT, COD, KMnO₄).

A l'approche de l'été, la Figure 109 indique une dispersion plus importante des stations. Les « clusters » observés par l'ACP mettent en évidence des processus bien distincts. En mars, les stations sont surtout marquées par les nitrates et l'oxygène dissous à l'opposé de la température. Cela explique que les apports en nitrates s'effectuent lorsque les températures des eaux sont basses, par conséquent, en fin de période hivernale. Ces résultats sont toujours en accord avec les ACP réalisées précédemment (chapitre III). En revanche, les stations les plus marquées par le phosphore et les phosphates sont les stations TR et ASTEP en début de période estivale (Mai, Juin). La station ASTEP étant située en aval d'une station d'épuration, elle transfère les polluants dans le lac de Ribou (station ZB) *via* la station TR. Ce qui explique en partie l'eutrophisation de la station TR. Ces résultats confirment bien que la station la plus eutrophe reste la station TR par rapport aux stations AV et ZB. La station ZB (Mai et Juin) est marquée par une bonne corrélation entre les cyanobactéries contenues dans les biofilms et l'ion ammoniacal qui sont représentés par la composante 2. En effet, les cyanobactéries sont capables d'excréter les ions NH₄⁺ (Web 8). Ces paramètres sont à l'opposé de l'oxygène dissous, par conséquent, en milieu réducteur. Lorsque les proportions de cyanobactéries deviennent plus importantes dans les biofilms, les concentrations en NH₄⁺ augmentent également par assimilation de l'azote atmosphérique pour le transformer en ion ammoniacal (Levi, 2007). Les résultats sont alors cohérents avec les données *in situ*.

Pour confirmer le diagnostic, une autre étude est mise en évidence sur la Figure 110. Cette dernière représente le nombre de couples de variables ayant un coefficient de corrélation $r > 0,6$ selon les stations étudiées. Ces résultats sont issus d'une importante banque de données comprenant près de 200 campagnes allant de janvier 2005 à juin 2007.

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

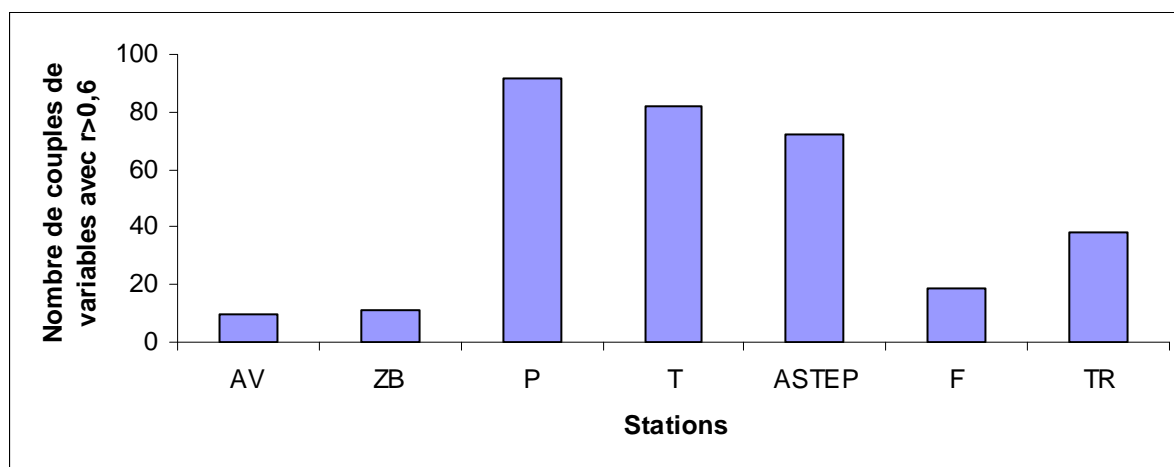


Figure 110 : Nombre de corrélations entre les différentes variables dont $r > 0,6$

Cette étude montre que le nombre de corrélation entre les variables est plus important au niveau des stations T, P, ASTEP où le nombre de corrélation dépasse 60, contrairement aux stations AV et ZB où leur nombre atteint à peine 10. Cette approche est intéressante car des auteurs ont montré, sur des eaux tropicales (Parinet et coll., 2004), que le nombre de corrélation augmentait selon le niveau d'eutrophisation du milieu. Dans le cadre de cette étude, les stations les plus marquées par l'eutrophisation sont P, T et ASTEP. Comme il a été montré précédemment, la station TR est plus marquée par l'eutrophisation que les stations AV et ZB. Certaines stations s'assèchent facilement notamment la station P. C'est pourquoi, le volume d'eau étant moins important, les polluants sont plus concentrés ce qui explique que cette zone paraît eutrophe.

Les résultats d'ACP ont souligné les différentes corrélations entre les stations et les variables, puis au niveau des variables entre elles, ce qui permet d'établir un diagnostic par rapport aux eaux étudiées.

V.2/ DIAGNOSTIC ET REMEDE A L'ECHELLE DE LABORATOIRE

V.2.1/ Diagnostic et remèdes via les biofilms

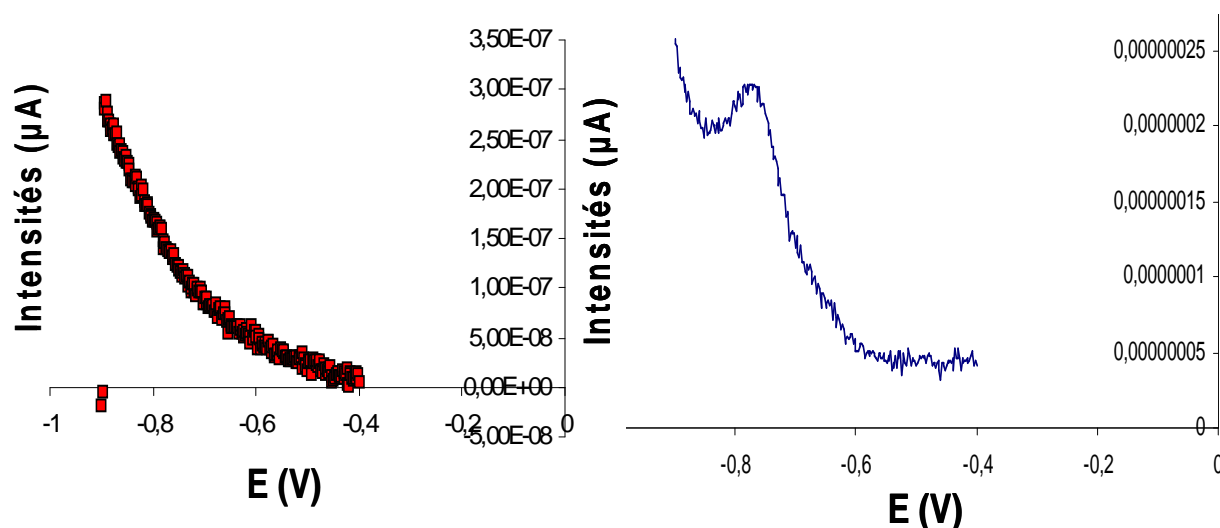
Dans le chapitre IV, nos études ont montré qu'un biofilm de $t=0$ jours jusqu'en phase stationnaire (8 – 10 jours selon les biofilms), transformait la MO sans abattement du COT dans nos conditions opératoires et qu'il permettait d'éliminer dans les eaux, par rétention,

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

certaines éléments chimiques (P, Fer, Mn, Zn, Al) qui sont considérés comme des polluants lorsqu'ils sont en excès dans ces eaux douces naturelles. Nous avons montré que la MO pouvait se transformer grâce au biofilm. Par conséquent, il nous a paru pertinent d'étudier l'impact du biofilm sur un type de composé organique, d'autant plus que, l'eau du lac de Ribou est soumis à des apports non négligeable de pesticides. Dans le cadre de cette étude, le résidu de pesticide étudié est le paranitrophénol qui est un sous-produit de dégradation du méthylparathion. Ce choix a été dicté par le fait que notre laboratoire est équipé d'outils analytiques pour doser facilement ce type de composés organiques. De plus, des travaux réalisés lors des études antérieures (Thorén, 2007) ont montré que des molécules simples comme l'urée pouvaient être dégradée par les biofilms épiphytiques.

Dans notre approche, nous avons étudié l'impact des biofilms sur la (bio)dégradation du paranitrophénol (PNP).

La Figure 111 montre les voltammogrammes de détection du paranitrophénol à $t=0h$ et à $t=12h$.



a/ Eau dopée en PNP exposée au biofilm ($t=12h$) b/ Eau dopée en PNP, non exposée au biofilm ($t=0h$)

Figure 111 : Voltammogrammes de détection du paranitrophénol

La Figure 111 montre que l'eau dopée ayant circulé dans le réacteur à biofilm ne

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

présente plus de pic de réduction à $-0,8$ V au bout de 12h alors que pour la solution qui a circulé 12h dans le bioréacteur de référence (sans biofilm) celle-ci présente toujours le pic de réduction du PNP (non représenté) comme à $t=0$ h, avec la même intensité de pic d'environ $0,25 \cdot 10^{-7}$ A. De plus, le PNP présente une couleur jaune caractéristique ($\lambda_{\text{max.}}=400$ nm) et après 12h de mise en contact avec le biofilm épiphytique la couleur jaune a disparu, alors qu'elle reste présente dans le réacteur de référence.

Les résultats obtenus montrent que le biofilm a contribué à la transformation du paranitrophénol qui n'est plus décelable dans l'eau de surface. Le processus de biodégradation peut être attribué à un relargage des nitrites avec minéralisation en dioxyde de carbone, ou bien, engendrer la formation de composés comme des catéchols. Cela dépend des microorganismes exposés à ce polluant (Kulkarni et Chaudhan 2007). Les biofilms élaborés à partir d'une eau naturelle étant composés d'une multitude de communautés de microorganismes, plusieurs de ces dérivés (non recherchés dans le cadre de notre étude) et issus de la dégradation du PNP, pourraient être mis en évidence.

Un autre polluant « modèle » : les nitrates, a été étudié.

Dans ce cas l'eau de surface de l'étang St Nicolas a subi un dopage en nitrates à des concentrations supérieures à 100 mg/L. Cette solution a été exposée en continu au niveau du biofilm pendant 3 jours. Il s'agit de la même eau utilisée pour l'élaboration du biofilm.

La Figure 112 montre l'évolution de la concentration en nitrates au cours du temps au sein de bioréacteurs constitués de biofilms élaborés à partir d'eaux naturelles eutrophisées. Un réacteur est constitué par un biofilm âgé de 15 jours sur lequel a circulé la même eau ayant été utilisée pour l'élaboration du biofilm mais préalablement dopé avec une concentration en nitrates supérieure à 100 mg/L et un réacteur témoin (sans biofilm).

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

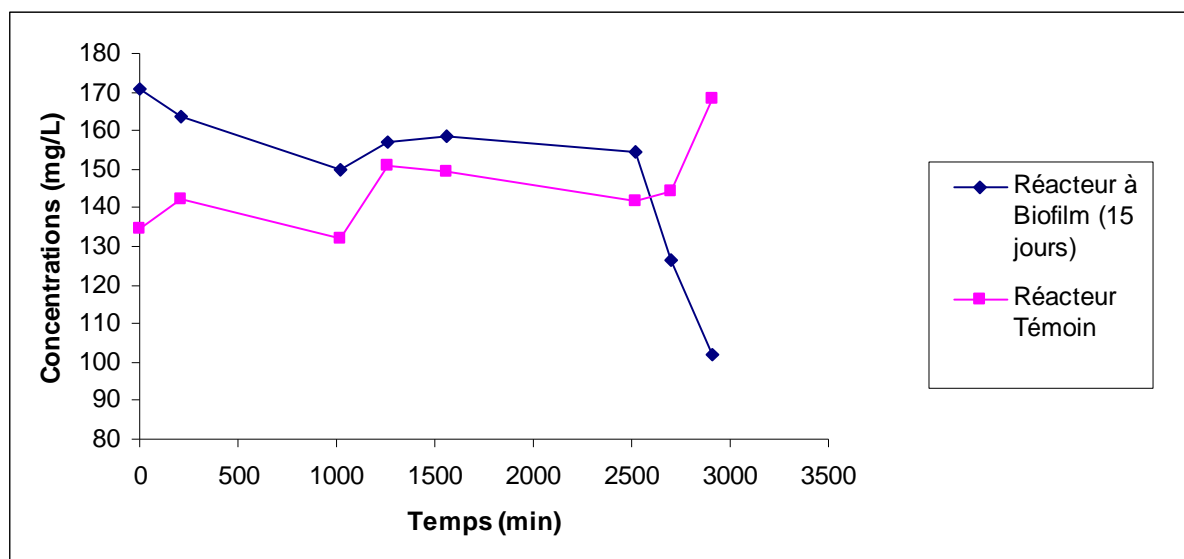


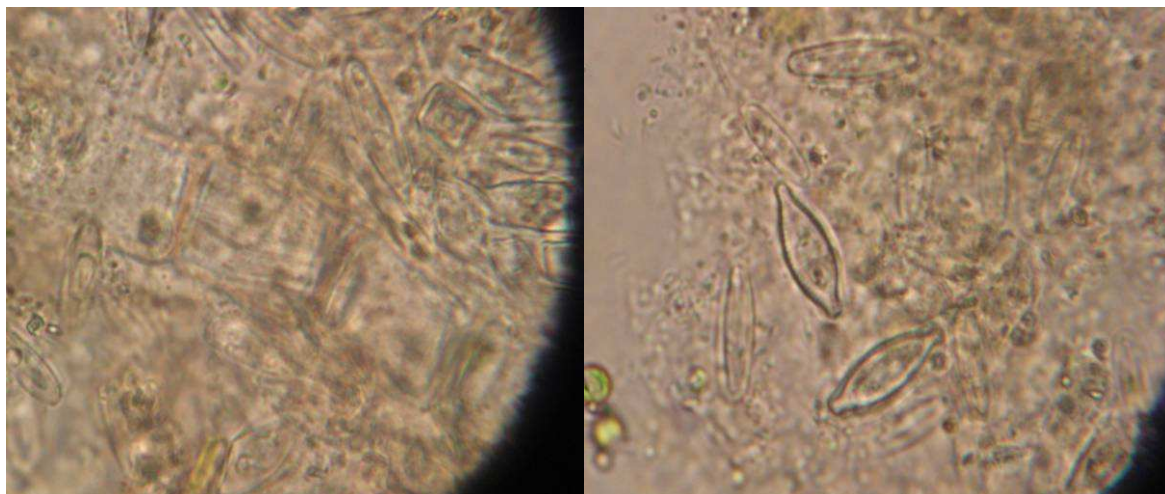
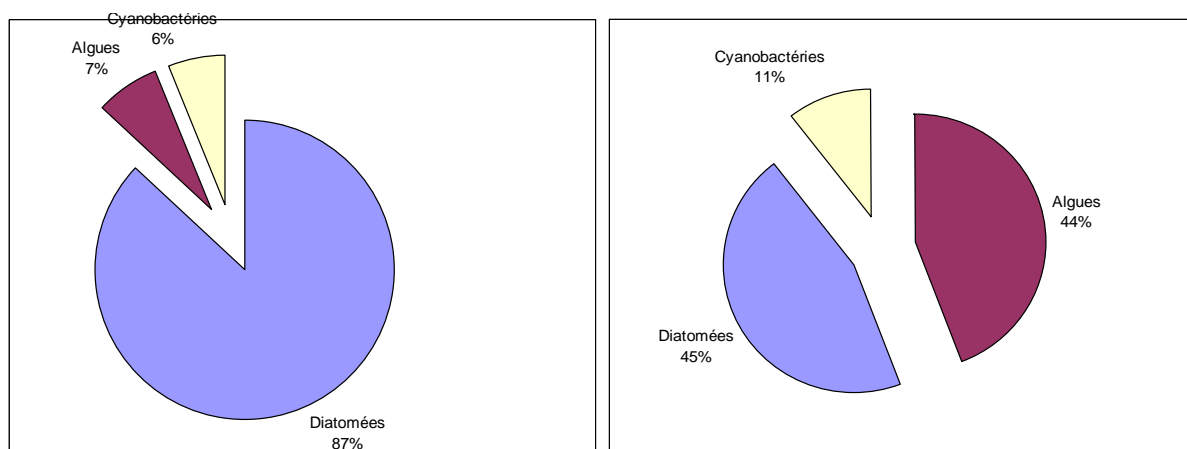
Figure 112 : Evolution de la concentration en nitrates au cours du temps dans les réacteurs à biofilm et témoin.

La Figure 112 montre un abattement en nitrates dans les réacteurs colonisés par les microorganismes. Cette élimination en nitrates est presque divisée par deux après environ 3000 min (~ 2 jours) de contact « eau-biofilm », alors que dans le réacteur témoin, aucun abattement n'a été observé après ce temps d'expérimentation. Ces résultats préliminaires montrent ainsi l'efficacité d'un biofilm à réduire les concentrations en nitrates dans les eaux naturelles eutrophisées.

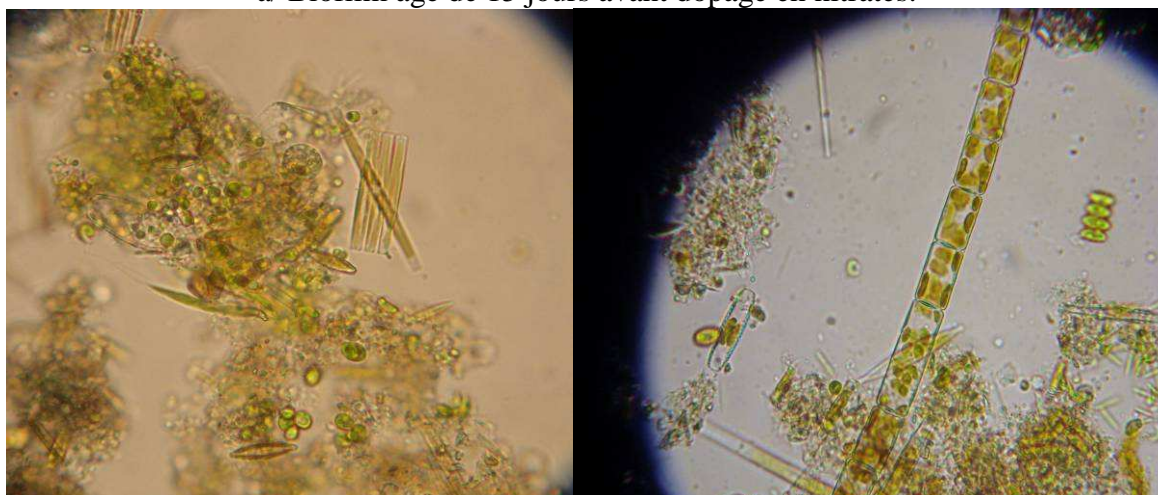
V.2.2/ Caractérisation des biofilms avant et après dopage en nitrates.

Nous avons également suivi l'influence des nitrates sur l'évolution du biofilm qui n'est pas une « entité » statique. La Figure 113 représente l'abondance relative entre diatomées, cyanobactéries et algues avant dopage et après dopage de l'eau en nitrates. Des illustrations correspondantes des biofilms, obtenus au microscope optique à un grossissement ($\times 1000$), après décrochage de leurs supports, sont aussi représentées.

CHAPITRE V : ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE



a/ Biofilm âgé de 15 jours avant dopage en nitrates.



b/ Biofilm après dopage en nitrates à 170 mg/L dans l'eau naturelle. Les observations au microscope optique ($\times 1000$) sont réalisées 3 jours après le dopage sur le même biofilm.

Figure 113 : Abondance relative entre diatomées, algues et cyanobactéries

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

La Figure 113 montre des différences entre le biofilm avant dopage et après dopage en nitrates. En effet, avant le dopage, la plupart des espèces présentes au sein du biofilm apparaissent décolorées, alors qu'après le dopage, de nombreuses espèces sont colorées avec un développement important d'algues et de cyanobactéries. Ces résultats montrent que la consommation des nitrates est favorable aux développements d'algues avec production de chlorophylle et sont confirmés par l'ACP qui montre que la chlorophylle *a* est à l'opposé des nitrates (Paragraphe III.2). Ces résultats laissent supposer que l'élimination des nitrates dans l'eau s'effectuerait majoritairement par l'assimilation par les « microorganismes » et préférentiellement par les algues vertes, c'est-à-dire par transformation des nitrates en azote organique. La dénitrification ayant lieu en milieu anaérobie, il est peu probable que cette dernière ait lieu dans nos conditions opératoires. Cependant, elle pourrait avoir lieu de manière négligeable car au sein d'un biofilm, des zones anaérobies peuvent être présentes. Par la suite, l'étude a porté sur l'évolution des communautés de diatomées précisément pour mettre en évidence l'influence des nitrates sur les communautés initialement présentes dans les eaux naturelles. La Figure 114 montre ainsi, l'abondance relative entre chaque espèce et genre de diatomées présentes dans les eaux avant et après dopage en nitrates.

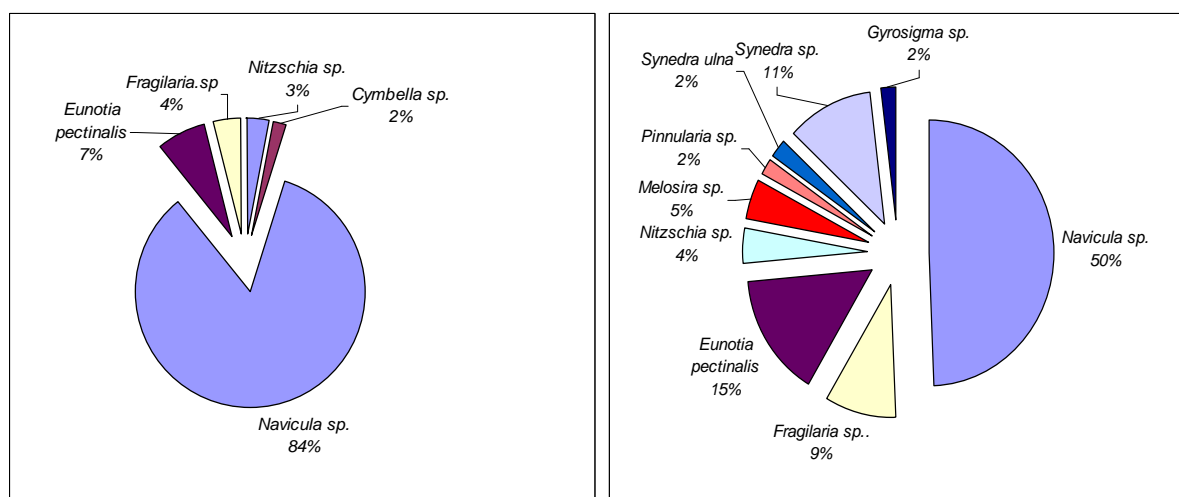


Figure 114: Abondance relative entre les communautés de diatomées avant et après dopage en nitrates au sein d'un biofilm (3 jours d'expositions).

La Figure 114 montre que le dopage en nitrates contribue à une augmentation d'un nombre d'espèces de diatomées après 3 jours d'exposition. En effet, les genres *Synedra sp.*, *Melosira sp.* et l'espèce *Eunotia pectinalis* apparaissent après dopage en nitrates, alors que *Navicula sp.*

CHAPITRE V : ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

(84 %) est fortement majoritaire avant dopage et elle représente 50 % après dopage. Le dopage en nitrates dans nos conditions opératoires (sur 3 jours) contribue à l'augmentation de la biodiversité. Une autre étude a été conduite à partir d'une autre eau naturelle issue de la même station de prélèvement avec 3 semaines d'intervalles. La Figure 115 montre l'abondance entre les communautés de diatomées avant et après dopage en nitrates au sein d'un biofilm de composition en diatomées différentes (7 jours d'exposition).

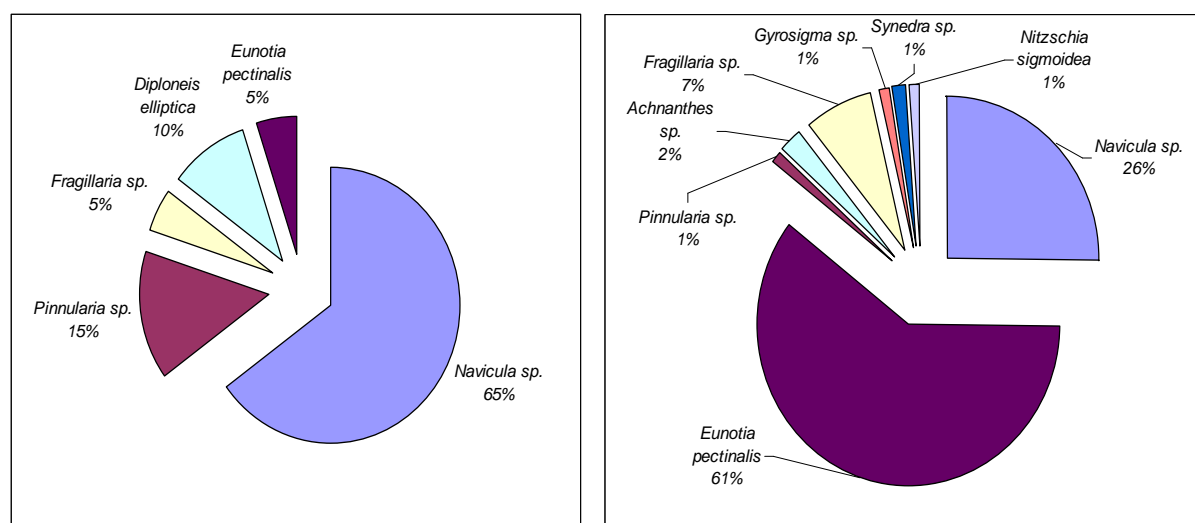


Figure 115 : Abondance relative entre les communautés de diatomées avant et après dopage en nitrates au sein d'un biofilm (7 jours d'exposition).

La Figure 115 montre que le dopage en nitrates contribue à une augmentation d'un nombre d'espèces (ou genre) de diatomées après 7 jours d'exposition aux nitrates. Le développement d'*Eunotia pectinalis* est très marqué après le dopage en nitrates et représente 61 % des espèces dénombrées, alors qu'avant le dopage, c'est le genre *Navicula sp.* qui est le plus répertorié (65 %), quant à *Eunotia pectinalis*, elle ne représente que 5 %.

Comme précédemment, l'apport important d'azote comme nutriment contribue au développement de certaines diatomées et à une augmentation de la biodiversité. Cependant, le développement important d'*Eunotia pectinalis* laisserait présager, à terme, une perte de biodiversité. Afin d'étudier l'état de surface avant et après dopage, des analyses ont été effectuées au MEB. La Figure 116 montre une illustration de biofilms élaborés sur des anneaux de verres, avant et après dopage en nitrates.

CHAPITRE V: ELARGISSEMENT DE L'ETUDE A L'ECHELLE DE BASSIN VERSANT ET DU LABORATOIRE

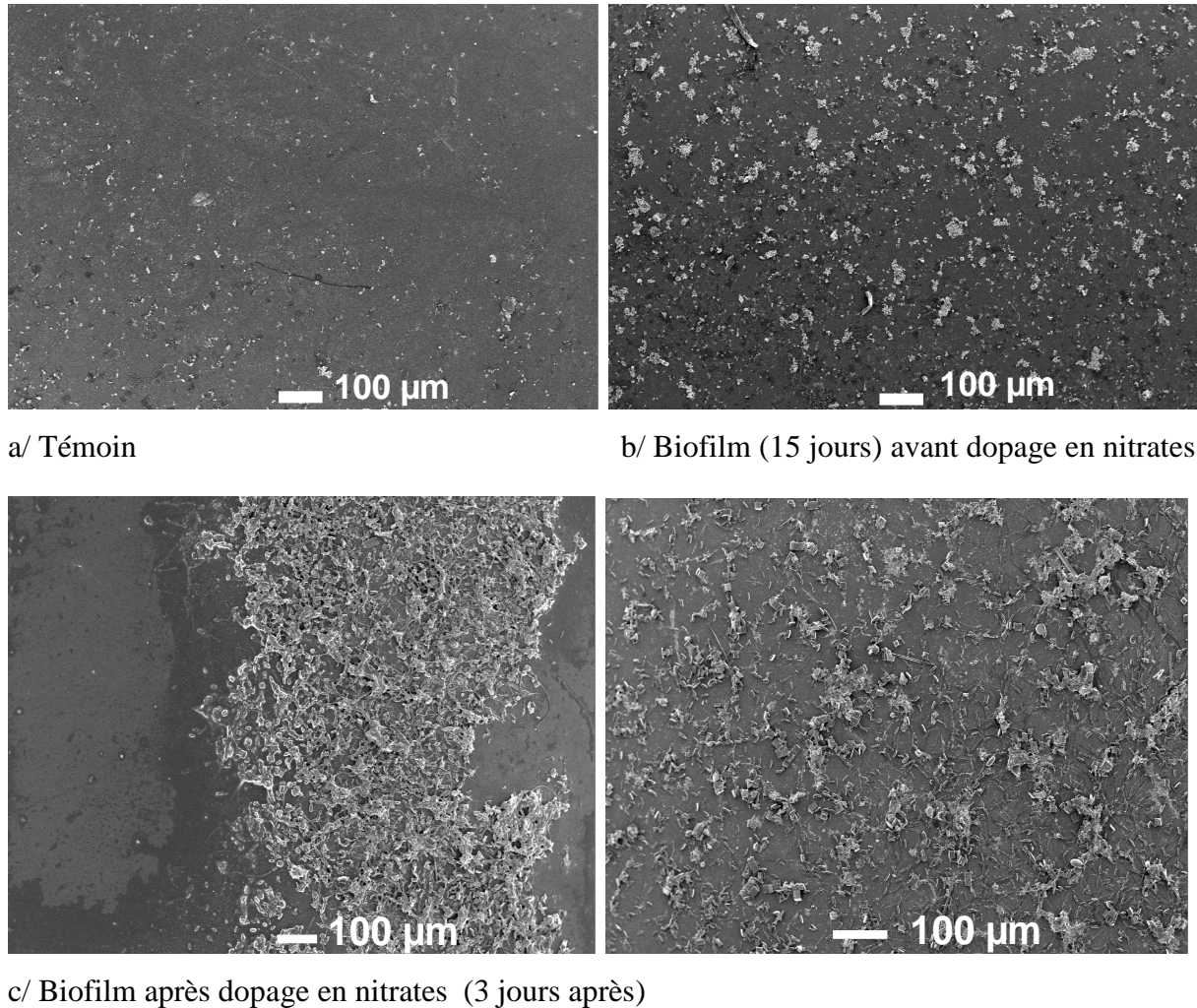


Figure 116: Illustration des biofilms sur le garnissage en verre du bioréacteur (observations réalisées au MEB à 3 keV)

La Figure 116 montre que le dopage en nitrates contribue à augmenter « l'encrassement » des anneaux, et notamment la colonisation de ces supports par les algues et les diatomées.

Compte tenu de l'ensemble des résultats obtenus à travers tous les chapitres, nous allons les discuter afin de proposer des perspectives de traitement à l'échelle du BV.

CHAPITRE VI : DISCUSSION

A l'issue de ce travail, les principaux résultats montrent que l'association végétaux/biofilms épiphytiques au sein d'une zone humide est une bonne approche pour améliorer la qualité d'une eau. En plus des capacités épuratoires des végétaux par absorption/phytoremediation (Pulford & Watson, 2003), ces derniers sont en général de bons supports à biofilms au niveau de la partie immergée (biofilm épiphytique) et que ces biofilms sont capables de retenir le P et les métaux, ce qui engendre une diminution de leurs concentrations dans les eaux qui sont dépendantes des conditions physico-chimiques. De plus, bien qu'aucun abattement de COT n'a été observé, la MO a néanmoins été modifiée par les biofilms dans les eaux révélant sa biodégradabilité.

L'intérêt des zones humides est reconnu à travers trois fonctions essentielles qui sont premièrement un accueil de la biodiversité et deuxièmement, une régulation des crues et des flux hydrographiques. En effet, une étude de modélisation des flux hydriques réalisée sur le BV du lac de Malle, en Mauritanie, a montré que les zones humides pouvaient limiter ces flux après les périodes de forte pluie (Gassani, 2008) qui sont les vecteurs de polluants en aval du BV. Enfin, ces zones humides ont un rôle épuratoire (lagunes (Morel *et coll.*, 1994b ; Pietrasanta et Bondon, 1994), mares), en effet, elles permettent de retenir les polluants et de les éliminer partiellement par biodégradation et/ou immobilisation par le biais de la végétation présente (Pulford et Watson, 2003).

Pour replacer le cadre de ces travaux à l'échelle du Bassin Versant, il faut traiter dans un premier temps, les problèmes d'apports en polluants plus en amont du BV en limitant les rejets. Des chantiers de drainage ont été réalisés vers 1980 et ont engendré de nombreux arrachages de haies. Ces travaux ont alors transformé les paysages et les flux hydriques. Les haies ont un rôle tampon vis-à-vis des polluants comme le P. Par conséquent, ce dernier sera moins retenu jusqu'à se retrouver dans le réseau hydrographique (Dorioz et Aourousseau, 2007). Puis, suite à ces travaux, à partir de 1985, les premiers épisodes d'eutrophisation sont apparus car le P constitue l'élément limitant dans les eaux douces. Son excès est favorable à un développement excessif de cyanobactéries produisant des toxines dangereuses pour les hommes et les animaux (Lévi, 2007). De plus, le P ne présente pas de cycle atmosphérique. Par conséquent, cet élément s'accumule dans les sols, les sédiments et les eaux et doit être extrait (Dorioz et Aourousseau, 2007). A ce jour, des actions sont déjà mises en œuvre par la

CAC pour limiter les flux de P et de MO en amont, notamment par la mise en place de zones tampons comme des prairies et des zones enherbées (Dorioz et coll, 2007). Un suivi de la composition chimique de l'eau et la réalisation d'inventaires floristiques a permis d'évaluer l'état du BV. Ces approches sont nécessaires pour des perspectives de restauration du milieu (Miletti et coll, 2005). La connaissance du milieu naturel permet de cibler les zones de rejets du P et de la MO afin de trouver des solutions pour réduire les apports. De plus, la CAC a aussi pour objectif de trouver des moyens d'extraire également le P qui est déjà accumulé depuis des années dans la retenue du Ribou. C'est pourquoi, à partir des résultats obtenus lors de ces travaux de thèse, nous trouvons pertinent de mettre en place des zones humides à l'échelle du BV qui peuvent être aménagées par des végétaux autochtones sur lesquels se développent les biofilms, d'autant plus que l'association bactéries et macrophytes améliorent nettement la biodégradabilité (Mann et Wetzel, 2000 ; Picard et coll, 2005). Les plantes doivent créer un environnement favorable aux développements des microorganismes par des échanges gazeux au niveau racinaire (Picard et coll, 2005). De plus, nous avons montré que le biofilm seul, élaboré en laboratoire, est aussi efficace dans l'élimination des polluants (P, métaux, type de MO (dégradation des acides humiques, élimination du paranitrophénol des eaux)). Ces biofilms sont élaborés à partir d'une eau naturelle au sein d'un pilote de laboratoire, par conséquent, nous supposons que le biofilm épiphytique exposé à un même type d'eau doit être capable d'éliminer le P, les métaux et transformer la MO. D'autant plus que dans le milieu naturel, en analysant un biofilm épiphytique, ce dernier contient du P et les mêmes métaux (Fe, Mn) ce qui laisse supposer qu'ils doivent être éliminés de la colonne d'eau du fait que ces éléments ne n'ont de cycle atmosphérique. Par ailleurs, des auteurs ont montré que le biofilm épiphytique a des capacités épuratoires vis-à-vis de la dénitrification et de l'urée (Bourgues et Hart, 2007 ; Thorén, 2007) montrant l'intérêt d'un biofilm naturel.

L'eau du lac de Ribou étant de nature eutrophe, les concentrations en P sont alors situées entre 0,08 et 1 mg.L⁻¹ par an, ce qui fait une moyenne annuelle de 0,54 mg.L⁻¹. Par conséquent, le prélèvement au niveau de l'usine contribuerait à éliminer 3,14 Tonnes de P/an. Sachant que chaque année le Bassin Versant libère 18,7 Tonnes de P (CAC, 1998), ce dernier s'accumule au cours des années au niveau des rivières et des retenues. C'est pourquoi, même si les actions pour restaurer le BV doivent être conduites sur son ensemble, nos travaux ont été ciblés, dans un premier temps, au niveau de la station TR car elle apparaît comme étant la plus eutrophe des stations du lac de Ribou. En effet, cette dernière apparaît plus marquée par

le P et la MO (COT, COD) comme l'a révélé l'ACP (Figure 32). De plus, nous rappelons que cette zone constitue un point d'entrée de la pollution « émanant » du bassin versant du Trézon avec un flux hydrique moyen de 10,8 Mm³/an. Cette station TR constitue une zone aménageable car le niveau d'eau est bas et varie entre 50 cm et 2 m de profondeur. Cette dernière est riche en végétations rivulaires, mises en évidence par les inventaires floristiques. La contribution des macrophytes et des végétaux de la zone rivulaire présente un intérêt à la restauration de la qualité de l'eau (Korner et Vermaat, 1998 ; Korner et coll, 2003 ; Pulford et Watson, 2003 ; Verveake et Luyssaert, 2003 ; Sondergaard et coll, 2007). De plus, des auteurs ont montré que les espèces végétales rivulaires comme *P. arundinacea*, *Salix sp*, *Juncus effusus* sont potentiellement intéressantes dans le cadre de l'épuration du P et de la MO (Picard et coll, 2005 ; Perttu et Kowalik, 1997 ; Steinmann et coll, 2003) certainement assistée par les biofilms. Néanmoins, dans le cadre de notre étude, il est nécessaire de tenir compte de plusieurs facteurs pour sélectionner les macrophytes les plus favorables aux conditions du milieu. L'installation spontanée d'espèces autochtones qui disposent d'une dynamique de population relativement stable, révèle que le végétal présente une bonne adaptation au milieu. L'espèce doit montrer des capacités épuratoires importantes vis-à-vis du P. Enfin la présence de cette espèce doit persister au cours du temps et ne doit pas avoir un caractère envahissant afin de ne pas bouleverser l'écosystème. Parmi les espèces autochtones répertoriées, quatre candidats s'avèrent intéressants :

- La **Baldingère ou Faux roseau (*Phalaris arundinaceae*)** est très efficace pour l'épuration du P (Picard *et coll*, 2005) et de la MO (Ouellet-plamondon *et coll*, 2004). Ces résultats sont néanmoins obtenus au sein de microcosmes et concernent le phosphore assimilable. Par conséquent, ils doivent être nuancés dans les conditions naturelles. Néanmoins, cette espèce possède des rhizomes qui lui permettent d'être présente toute l'année sur le site et résiste bien à la pollution et à de grandes variations d'eau (de 0 à 1 m de profondeur). Tous ces paramètres montrent que cette espèce peut être potentiellement intéressante à utiliser *in situ*.
- Les **Saules (*Salix sp.*)** sont aussi de « bons candidats potentiels » dans l'élimination du P (Perttu et Kowalik, 1997) qui pourrait être utilisés dans le cadre de la restauration du milieu.
- Les **Petites lentilles d'eau (*Lemna minor*)** jouent un rôle épuratoire important dans l'élimination des phosphates (Öbek et Hasar, 2002). Cependant, dans le cadre de notre étude, il n'est pas envisageable d'utiliser ces macrophytes pour l'épuration du milieu

car en 2007, les lentilles d'eau ne se sont pas développées. Ces dernières semblent être sensibles aux conditions environnementales et leurs déplacements sont peu contrôlables dans le milieu naturel.

- Les **Joncs épars** (*Juncus effusus*) sont des espèces intéressantes car elles ne se décomposent pas rapidement au sein du milieu et peuvent contribuer à limiter les flux de P au sein des zones humides.

Le potentiel épuratoire de ces différentes espèces dans les conditions décrites par les auteurs permet d'envisager leur efficacité au sein des zones humides aménagées de type « lagunage à macrophytes » (Morel *et coll*, 1994b ; Pietrasanta et Bondon, 1994). Cependant, des expérimentations *in situ* s'avèrent essentielles pour évaluer leurs capacités épuratoires vis-à-vis des eaux du lac de Ribou, tout en sachant que la présence de végétaux dans les bassins de lagunage permet d'améliorer l'élimination des nutriments (Morel *et coll*, 1994b ; Pietrasanta et Bondon, 1994).

Les végétaux associés aux biofilms devraient avoir un rôle à joué dans l'élimination simultanée du P (Picard *et coll*, 2005) et de la MO (Sondergaard et Jeppesen, 2007 ; Steinmann *et coll*, 2005) avec l'intervention du biofilm épiphytique qui jouerait un rôle important dans l'élimination de certains polluants (Bourgues et Hart, 2007) comme il a été mis en évidence dans le cadre de notre étude. En revanche, les végétaux sont capables d'accumuler de la MO présentes dans les eaux comme les pesticides. L'élimination des MO dans les eaux peut se faire par l'assimilation au niveau de la plante ou bien par adsorption/assimilation/biodégradation par les biofilms suivi de leurs transformations avec certainement une phase de minéralisation de cette MO. Le problème des végétaux est que ces derniers se décomposent et par conséquent relarguent de la MO, mais selon les espèces végétales, le relarguage peut être plus ou moins important (Kao *et coll*, 2003). Lors de cette décomposition, le biofilm peut aussi être retrouvé à nouveau dans l'eau d'où la nécessité d'extraire ces plantes.

Pour traiter la MO, le biofilm s'avère être une solution appropriée. De plus, les végétaux sont également de bons supports à biofilms comme l'on montré d'autres auteurs aussi bien au niveau de l'épiphyte (Bourgues et Hart, 2007) que du benthique (Gagnon *et coll*, 2007). Les résultats prometteurs que nous avons obtenus (chapitre III et IV) confirment le

travail de ces auteurs. De ce fait, nous avons étudié plus particulièrement l'impact des biofilms sur la MO contenue dans les eaux de surface en milieu contrôlé. Des études en laboratoire se sont avérées indispensables et ont montré que les biofilms jouent un rôle dans la transformation de la MO que nous avons suivi par la diminution de la fluorescence des fluorophores A et C (Figure 60) correspondant aux substances humiques avec une augmentation des fluorophores T et B qui correspondent à l'activité biologique (Senesi et coll, 1991, Parlanti et coll, 2000) surtout visible après le fractionnement des eaux car ils apparaissent au niveau des fractions HPI (Figures 61, 62, 63, 64). La pyrolyse CG-SM est très utilisée pour l'analyse de la MO par l'étude des sous-produits de dégradation de pyrolyse (Bruchet et coll, 1990 ; Zularisam et coll, 2006 ; Demeusy, 2007 ; Vancampenhout et coll, 2009). A chaque sous-produit est attribué une origine, comme par exemple les dérivés de benzènes, toluène, xylène qui sont issus de composés polyaromatiques : les acides humiques. D'autres, comme le furfural, le cyclopenten-1-one correspondent à des sous-produits de polysaccharides (Pontie et coll, 2007) seulement retrouvés dans les fractions HPO dans notre étude. Ces derniers peuvent être apportés dans les eaux par la décomposition des plantes par les microorganismes (Leenheer et Croué, 2003). Les processus microbiologiques ont lieu dans les eaux de surface (Bruchet, 1985) et se poursuivent dans le bioréacteur à 28-30°C comme nous l'avons constaté. En observant les fractions TPH, des sous-produits caractéristiques sont retrouvés comme le 5-méthylfurancarboxaldéhyde, l'acide hexadecanoïque, le 9-octadecenamamide et le bis-(2-éthylhexyl)phtalate. Ce dernier est un marqueur anthropique (Aparicio et coll, 2007). Après traitement par le biofilm, des sous-produits non déterminés apparaissent à des temps de rétention de 9,15min et 6,28min (Tableau 19 et Figure 67) montrant qu'il y a bien eu une activité biologique sur les fractions TPHR avec une diminution nette des proportions de 5 méthylfurancarboxaldéhyde (de 40% à 29 %) et d'ac hexadecanoïque (de 42% à 22%) (Tableau 19 et Figure 67). Cette technique a permis de montrer une transformation de la MO dans les eaux naturelles par les biofilms, aussi bien dans les fractions HPO que dans les fractions TPH (comparaison avant et après traitement au sein du bioréacteur, Figures 66, 67) avec l'apparition de fragments caractéristiques de l'activité biologique qui sont attribués aux biofilms comme le 2-butanone qui apparaît dans les fractions HPO (Demeusy, 2007) et disparition du 4 méthylphénol révélant ainsi la dégradation des acides fulviques/humiques caractéristiques de la fraction HPO (Leenheer, 1981).

Pour évaluer la capacité d'un biofilm à dépolluer une eau naturelle, un polluant modèle a été testé avec un temps de demi-vie de 3 ans et correspondant à un sous-produit du

méthylparathion (pesticides) : le paranitrophénol (Sbaï et coll, 2007 ; Tapsoba et coll, 2009). Une étude préliminaire en bioréacteur a montré que le biofilm a permis son élimination dans les eaux de surface dopées avec 50 mg/L de ce composé. Ces résultats ont montré l'efficacité des biofilms à épurer les eaux naturelles. Une autre étude a montré que les biofilms photosynthétiques pouvaient éliminer les microcystines produites par les cyanobactéries (Babica et coll, 2005) toxiques pour l'homme (Levi, 2007). Par ailleurs, d'autres études ont aussi montré l'efficacité des réacteurs à biofilms à éliminer les pesticides (Paul et Queinnec, 2008). Les résultats obtenus en laboratoire sur l'impact des biofilms au niveau des eaux naturelles, laissent supposer que ces derniers, dans le milieu naturel, joueraient un rôle important dans la transformation de la MO contenue dans les eaux de surface.

Pour l'étude du P, nous avons aussi montré que cet élément est présent au sein d'un biofilm épiphytique. Par conséquent, si ce dernier est retenu par le biofilm et qu'il n'y a pas de cycle atmosphérique du P (Rodier, 2000), il devrait être éliminé des eaux de surface, comme nous l'avons montré au sein d'un bioréacteur. En effet, les concentrations de P dans les biofilms étudiés en laboratoire et âgés de 13 jours varient de **0,31 (AV) à 1,00 µg/cm² (TR2)** (Figure 82). Le biofilm est élaboré à un débit de 11 L.min⁻¹. D'autres auteurs, en 2004, Jobgen *et coll* ont montré que l'aménagement de supports inertes composés de polypropylène dans un lac eutrophisé était envisageable pour extraire le P (100 mg/m² après 4 mois d'immersion soit **10 µg/cm²**). Aussi bien dans les biofilms issus directement des eaux anthropisées que dans les biofilms élaborés en laboratoire, le P est incorporé dans les deux cas. L'implantation de supports végétaux ou autres (plastiques, polypropylènes) dans le milieu naturel constituerait une surface potentielle pour l'élimination du P par son incorporation dans les biofilms. Les données obtenues sur du terrain révèlent qu'au sein du BV, le rejet du P a été estimé à **18,7 Tonnes** (Coyne et Bélier, 1994). En conséquence, pour être efficace, notre modèle doit évaluer des surfaces efficaces de biofilms atteignant les **6,03.10⁸ (AV) à 1,87.10⁹ (TR2) m²** en tenant compte des zones de rejets à l'échelle de l'ensemble du BV. L'aménagement de zones tampons pourrait être situé en sortie des 5 STEP du BV et/ou de zones de rejets industriels.

La station TR est plutôt de nature mésotrophe avec des flux moyens en P transitant par cette station, évalués à **3,5 Tonnes/an**. Le **diamètre** moyen d'une tige de *Phalaris arundinacea* est évalué à **0,01m** avec une hauteur moyenne atteignant les **1,25m**. En supposant que ce végétal soit totalement immergé et assimilé à un cylindre, sa surface

potentielle qui peut être colonisée par le biofilm est estimé à **0,0387 m² (2 π r : périmètre)** par tige de *Phalaris*. Pour retenir tout ce P, il faudrait une surface de **3,5.10⁸ m²** entièrement colonisé soit **9.10⁹** tiges de *Phalaris*. La station TR a une superficie d'environ de **10 000 m²**, et l'aire d'une tige « vue de dessus » correspond à **7,85.10⁻⁵ m²**. Par conséquent, le nombre total de tiges permettant de retenir 3,5 T/an de P étant de **9,04.10⁹** ce qui représente une superficie (vue de dessus) supérieure à 10 000 m² (7,5. 10⁵m²). L'objectif étant de limiter les transferts de P sur le BV et aussi de l'extraire, il y aurait alors un problème d'espace pour l'aménagement au niveau de la station TR et cela ne serait pas suffisant. L'aménagement de cette zone ne suffit pas pour retenir tout le P de l'année en tenant compte que de la surface potentielle pouvant être colonisée par les biofilms. De plus, il y a aussi le P contenu dans les sédiments qui n'a pas été estimé mais nous supposons que sa teneur dans les sédiments est très importante puisque les problèmes d'eutrophisation ont débuté il y a environ une vingtaine d'année (Aquascop, 1998). La plante joue aussi un rôle important dans l'assimilation du P qui n'a pas été estimé durant notre étude (Picard et coll, 2005 ; Steinmann et coll, 2003) mais qui peut contribuer à son élimination ainsi que le biofilm du système racinaire. Ce dernier représente une surface non négligeable pour la formation du biofilm (Gagnon et coll, 2007).

D'une manière générale, cette approche nécessite un enlèvement des supports pour éliminer définitivement le P dont le cycle atmosphérique est inexistant. Cependant, la formation naturelle de biofilm serait intéressante pour limiter en amont les flux de P par rétention sur support à l'échelle du BV en aménageant les zones humides existantes ou bien en créant de nouvelles zones humides dans lesquelles des supports végétaux et/ou inertes pourraient être utilisés pour mener des études sur site en macrocosmes équipés.

Des éléments chimiques comme le Mn, le Fe, l'Al, le Si, le Zn, le K, le Ca (Figure 51 à 56) n'ont pas de cycles atmosphériques. Il faut donc souligner l'importance des biofilms dans la rétention de ces éléments chimiques qui ne peuvent être éliminés des eaux que par incorporation dans les biofilms (Hiernaux, 2005 ; Miyata et coll, 2007 ; Quintelas et coll, 2009). Nous avons montré que les éléments comme le Mn, le fer, l'Al, le Si sont les mieux incorporés dans les biofilms. En effet, le Mn est plutôt incorporé au niveau des premières couches de formation des biofilms (Figure 51 et 56) et est peu dépendant de l'épaisseur dans nos conditions opératoires contrairement au fer et à l'Al et au Si (Figure 95). Ces éléments sont surtout présents sous formes d'oxydes (Hiernaux, 2005 ; Miyata et coll, 2007). Comme pour le P, l'inconvénient est que ces éléments peuvent être relargués dans le milieu au

moment du décrochage des biofilms observés au sein du bioréacteur ou bien selon leurs degrés d'oxydation. Par exemple, le Fer (III) insoluble, contenu en milieu réducteur, est relargué par les sédiments pour former du Fer (II) qui est ensuite retrouvé dans la colonne d'eau. Ce relargage pourrait aussi avoir lieu au sein des biofilms épiphytiques en période estivale et lorsque la concentration d'oxygène dissous est faible. Dans le milieu naturel, le décrochage du biofilm peut contribuer à une pollution ponctuelle des eaux. Comme le biofilm présente un intérêt au niveau de l'épuration des eaux (chapitre IV et V), il est alors possible d'envisager d'utiliser le biofilm élaboré sur supports plantés (végétaux) dans le milieu naturel pour limiter les flux de polluants afin d'améliorer la qualité des eaux du BV ayant subi des altérations anthropiques. Dans le cas où le milieu naturel a subi une contamination par des excès de Fer, de Mn, d'Al et de Zn ainsi que d'autres (Quintelas et coll, 2009), il s'avère que le biofilm peut épurer ces eaux par incorporation des métaux qui est variable selon les eaux (Figure 70). Les éléments chimiques comme le Ca, le Mg, le K sont retrouvés dans les biofilms (Figure 82) mais leurs concentrations dans les eaux ne varient que très peu mais augmentent avec l'épaisseur du biofilm (cf station TR2, Figure 69,79) mieux visible avec l'ACP (Figure 95).

Les résultats obtenus sur les biofilms ont permis de mettre en avant une autre approche du biofilm qui apparaît comme un bioindicateur. Des travaux récents rapportés par Lyautey et coll (2008) et Morin et coll (2008) vont dans le sens de notre étude. En effet, les analyses physico-chimiques et microbiologiques des eaux et des biofilms traités par ACP ont montré que les stations étudiées au niveau du BV ont bien été discriminées. Notamment la station ZB est la plus propice au développement des cyanobactéries. En effet, nous avons montré que les biofilms épiphytiques présents dans cette station concentrent environ 20 % de ces microorganismes dès le mois de Mars (début printemps). De plus, des corrélations eaux et biofilms ont été mises en évidence notamment entre l'ion ammoniacal présent dans l'eau et les cyanobactéries contenues dans les biofilms. Les cyanobactéries sont capables de libérer ces ions par assimilation du diazote atmosphérique. Nos études ont aussi montré qu'en période de blooms de cyanobactéries, leurs proportions dans les biofilms diminuent par rapport aux diatomées et aux algues. Nous supposons que les conditions de développement étant favorables dans les eaux, les cyanobactéries auraient tendance à se décrocher du biofilm. Dans des conditions physico-chimiques non favorables, elles seraient retrouvées plus particulièrement dans le biofilm. Le biofilm « concentre » également de nombreuses espèces

de microorganismes qui sont déjà reconnues comme étant des bioindicateurs (chapitre I, Tableau 8) dont certaines comme *Melosira varians* sont représentatives de milieux organiquement enrichis.

Chaque station ont leurs propres caractéristiques chimiques et microbiologiques (mis en évidence au niveau des chapitres III, IV et V). En effet, nous avons observé que les concentrations des éléments chimiques étaient variables selon les biofilms (Hiernaux, 2005 ; Miyata et coll, 2007). Les proportions des sous-produits de pyrolyse CG-SM présents dans tous les biofilms étaient différentes selon les eaux étudiées. Les biofilms sont constitués de marqueurs spécifiques composés par les sous-produits de pyrolyse comme l'acetamidofuran (paroi bactérienne (Pontie et coll, 2005)), le 5-méthylfurancarboxaldéhyde qui est un sous produit de sucres (Demeusy, 2007). Dans d'autres biofilms, d'autres sous-produits comme des dérivés de benzènes, notamment le benzène dicarboxylique, qui souligne que ces biofilms contiennent des acides fulviques oxydés par les microorganismes (Saiz-Jimenez, 1994). Ces résultats montrent bien que les biofilms peuvent contenir de la matière organique naturelle (Carlson et Silverstein, 1994) qui doit favoriser l'installation de certaines communautés microbiennes ayant un profil métabolique caractéristique d'un biofilm naturel. De plus, des différences de communautés ont été observées selon les biofilms élaborés en bioréacteur, selon qu'il s'agisse d'une eau prélevée en été ou en hiver au sein d'une même station d'où l'influence saisonnière. Au sein d'un biofilm, la température, la lumière, et la stabilité hydrodynamique influencent les communautés bactériennes (Lyautey et coll, 2008). Au sein d'un biofilm épiphytique, les profils métaboliques sont très variables selon les stations et les végétaux d'une même espèce, laissant supposer une influence même des végétaux sur le biofilm puisque ces derniers exudent de la MO comme des protéines, des sucres, des polymères (Amiaud et Benezri, 2005). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les communautés sont déjà adaptées à consommer ces substrats des biolgs GN2. Il faut noter également que l'âge d'un végétal n'est pas contrôlé dans le milieu naturel. De plus, ce support évolue au cours du temps. Par conséquent, le biofilm doit être influencé par l'évolution de la plante et aussi le temps d'immersion (Rusznayak et coll, 2008). En effet, les communautés bactériennes présentes sur des tiges âgées de *Phragmites* (plus de 1 an) utilisent plus de substrats que les jeunes tiges (Rusznayak et coll, 2008). Aussi, certaines espèces bactériennes ont plus d'affinités à coloniser des supports que d'autres, par exemple l'espèce de *Pseudomonas fluorescens* qui est très représentée dans le milieu naturel (Labanowski, 2004).

Nous avons mis en évidence lors de cette étude conduite à l'échelle du BV du Ribou, des spécificités des biofilms, qui sont dépendants des eaux, par conséquent, des stations étudiées. Cependant, un biofilm sur un végétal peut être différent au sein d'une même station. Bien que l'on ne puisse pas universaliser les résultats obtenus, ces derniers restent encourageants pour affirmer que le biofilm apparaît comme un « biomarqueur » très dépendant des eaux et pouvant être caractéristique d'un type de pollution dépendant des concentrations notamment les métaux (Gold, 2002 ; Morin et coll, 2008). Il apporte alors des informations sur la qualité des eaux des rivières et retenues situées sur le BV.

Notre étude a permis de mettre en avant la pertinence de « l'outil biofilm naturel » qui pourrait apporter sa contribution dans l'évaluation de la qualité des eaux. Cependant, l'approche appliquée au niveau du bassin versant doit être poursuivie dans d'autres rivières et plan d'eau afin de mieux évaluer son intérêt.

CONCLUSION GENERALE

Tout d'abord, afin de cibler le site d'étude pour un aménagement futur, une ACP à partir d'une banque de données physico-chimiques établie sur 6 années, a été nécessaire pour définir la zone la plus anthropisée parmi les 3 stations de Ribou : TR, AV et ZB. La station TR étant la plus fortement marquée par le P et le COT, par conséquent, l'étude de diagnostic du milieu a commencé sur cette zone. Pour mieux connaître le milieu naturel, la réalisation d'inventaires floristiques a permis d'établir un diagnostic et de sélectionner les espèces végétales autochtones ayant des potentialités intéressantes à épurer le milieu considéré. L'utilisation des espèces autochtones confère plusieurs avantages. En effet, elles sont déjà adaptées localement au milieu et cela permet d'éviter un risque lié à l'introduction d'une flore allochtone. Cette étude a permis de mettre en évidence 21 espèces végétales en Mai et 12 en Octobre 2006. Parmi elles, il s'est avéré qu'un ensemble caractéristique de végétaux appelé *Phalaridaie* dont l'espèce caractéristique est *Phalaris arundinacea*, a été retrouvé dans le milieu, traduisant un bouleversement anthropique. Les autres principales espèces végétales repartoriées caractérisant la *Phalaridaie* sont *Rorippa amphibia*, *Lycopus europaeus*, *Alisma plantago-aquatica*, *Mentha aquatica*.

Dans un deuxième temps, nos travaux se sont focalisés sur l'étude du biofilm épiphytique, afin de mettre en évidence son rôle dans le milieu naturel qui était peu connu. Or, les capacités épuratoires des végétaux sont associées à la présence de ces biofilms composés d'algues et de bactéries. Lors de notre étude, 2 approches ont été mises en oeuvre : les biofilms directement prélevés sur le terrain, et ceux élaborés sur pilote en laboratoire, en conditions contrôlées. L'approche terrain a permis la mise en évidence et l'étude de la composition des biofilms sur 6 stations. *In situ*, au niveau de la station TR, des biofilms ont été mis en évidence sur les 11 végétaux étudiés (*Phalaris arundinacea*, *Lycopus europaeus*, *Salix sp.*) montrant ainsi qu'ils sont capables de se développer sur différentes espèces végétales dont l'abondance relative entre les algues, les diatomées et les cyanobactéries varie selon les végétaux, au cours du temps et selon les stations. Les cyanobactéries ne sont jamais majoritaires dans les biofilms alors qu'elles peuvent l'être dans les eaux en période de « blooms ». Par conséquent, il semblerait que les diatomées et les algues aient une affinité plus importante à se fixer sur un support végétal.

Dans le milieu naturel, le temps de colonisation n'est pas contrôlé pour les biofilms issus des végétaux. C'est pourquoi, l'utilisation de supports artificiels comme les bambous et les supports plastiques a permis de suivre l'évolution d'un biofilm naturel au cours du temps. Cette approche a permis de mieux contrôler le temps de colonisation et de comparer les biofilms selon les stations, avec d'importantes différences observées selon les points de prélèvements. En effet, ces résultats ont montré qu'après 8 jours de colonisation, les supports étaient très colonisés au niveau de la station TR (station la plus eutrophe) par rapport aux autres stations AV et ZB pour un même temps d'immersion. Par conséquent, le temps de colonisation des supports dépend alors de la station étudiée, et pourrait éventuellement apparaître comme un indicateur d'un niveau trophique d'une eau.

L'analyse chimique de la surface des biofilms par analyse EDX a aussi montré des différences de proportions très nettes entre les éléments chimiques contenus dans ces derniers. Les éléments les plus retrouvés dans les biofilms sont le Fe, le Mn, le Si, l'Al, le P, le Ca. De plus, la composition des biofilms apparaît stratifiée c'est-à-dire que le Mn est très présent dans les zones où les bactéries sont présentes sur les premières couches colonisées. Lorsque le biofilm s'enrichit en algues et diatomées, le Mn apparaît de manière moins importante voire il n'apparaît plus. La présence de Si est corroborée avec la présence de diatomées, alors que le Fer a été mis en évidence à tous les niveaux du biofilms tout comme le Ca et le P.

L'étude du milieu naturel ne permet pas d'avoir une approche quantitative pour évaluer les potentialités épuratoires des biofilms épiphytiques. C'est pourquoi, l'élaboration de biofilms en laboratoire et en milieu contrôlé sur un pilote s'est avérée essentielle pour mieux comprendre l'évolution de ces structures au cours du temps, et leurs impacts sur les eaux naturelles. Ces travaux ont alors contribué à une meilleure compréhension sur le rôle du biofilm réalisé à partir d'une eau naturelle, à l'échelle d'un bioréacteur. Tout d'abord, les résultats obtenus ont permis de montrer qu'il n'y avait pas d'abattement du COT et du COD par le biofilm dans nos conditions opératoires (environ 13 jours de colonisation avec un débit d'alimentation de 280 cm³/h). Néanmoins, une augmentation du COT est observée en sortie de bioréacteur et dépassant parfois les 1 mg/L, indépendamment des concentrations initiales en MO qui varient entre 6 et 10 mg/L pour les eaux d'alimentations selon les stations de prélèvements. Le COT a atteint des valeurs exceptionnellement élevées en sortie de bioréacteur de l'ordre de 16 mg/L sur la dernière campagne (10 mg/L en entrée, station TR2).

Nous avons pu attribuer cette augmentation aux relargages d'exudats par les microorganismes et aux décrochages des biofilms. Le COT étant un paramètre global qui ne permet pas de s'assurer de l'évolution de la MO dans les eaux étudiées. C'est la raison pour laquelle la MO a été fractionnée sur résine XAD-8 et XAD-4 pour isoler les fractions HPO (hydrophobes), TPH (transphiliques) et HPI (hydrophiles). Sur ces paramètres, des différences sensibles au niveau des proportions de COD au sein des fractions entre les eaux d'alimentation et de récupération ont été observées. Afin de corroborer ces résultats, des études plus précises par fluorimétrie 3D ont révélé des transformations de la MO visibles par des différences de densités de fluorescences des fluorophores A et C (substances humiques) et aussi des fluorophores B et T. Le passage dans le bioréacteur induit une augmentation des fluorophores B et T qui sont liées à l'activité biologique dans les fractions RHPI des eaux de stations ZB et AV. Pour les eaux de la station TR, les fluorophores sont plutôt de nature hydrophobe (augmentation de RHPO). De plus, l'étude des fractions HPO et TPH par pyrolyse CG-SM a également montré une activité biologique avec apparition de sous-produits de pyrolyse caractéristiques de cette activité (ex : 2-butanone), et l'apparition de pics plus importants de sous-produits de polysaccharides au sein de la MO contenues dans les eaux après passage dans le pilote (5-méthylfurancarboxaldéhyde).

D'autres paramètres ont été déterminés à l'échelle du pilote, comme le P et les métaux car ces éléments étaient présents dans les biofilms naturels (sur supports bambous, biofilms épiphytiques). Parmi les éléments mineurs retrouvés, l'Al, le Fe, le Mn et le Zn sont présents. Les autres principaux éléments également retrouvés dans les biofilms sont le Na, le Ca, le K, le Mg, le P et le Si. Connaissant la composition de l'eau et la teneur de ces éléments chimiques dans les biofilms, un indice d'incorporation a été déterminé dans le but de mettre en évidence les espèces chimiques qui sont les mieux incorporées comme le Fer, le Mn, le P, le Si, et l'Al. Ces éléments présents en faibles concentrations dans les eaux sont mieux incorporés que les éléments majeurs (Ca, Na, K, Mg). Le P est bien intégré car il constitue un élément essentiel à la vie des microorganismes présents dans les biofilms (bactéries, algues, cyanobactéries). Le Silicium peut être présent sous forme de silicates, il est aussi un élément constitutif des parois des diatomées et ces microorganismes sont largement représentés au sein des biofilms étudiés. Le Fe, le Mn et l'Al sont des métaux intervenant dans les cycles rédox. Les éléments majeurs comme le Na, le K, le S, et le Mg sont quant à eux faiblement incorporés dans les biofilms alors que leurs concentrations dans l'eau sont beaucoup plus importantes que pour les métaux. Finalement, les éléments chimiques formant des oxydes

comme le Fe, le Mn, l'Al et le Si, sont majeurs dans les biofilms. Ces éléments retrouvés dans ces « matrices de polysaccharides » élaborées en pilote sont similaires aux biofilms épiphytiques directement prélevés dans le milieu naturel. L'accès au paramètre épaisseur du biofilm a donné la possibilité de déterminer des « concentrations apparentes » pour les éléments les plus importants. Selon les biofilms, les concentrations de Al, de Fe, de Si et de P varient respectivement d'environ de 2,5 à 25 mg/cm³, de 5 à 7,5 mg/cm³, de 5 à 15 mg/cm³ et de 0,5 à 1,5 mg/cm³. Les concentrations en Mn sont toujours inférieures à 5 mg/cm³. Pour un temps de colonisation similaire, les biofilms contiennent les éléments chimiques dans des proportions différentes selon les eaux. Les concentrations en éléments chimiques varient également avec l'épaisseur de biofilm. Certains paramètres ne varient que très peu selon les épaisseurs. En revanche, l'Al, le Si et le Mn semblent très dépendants de ce paramètre. Les concentrations en Al et Si et en diatomées augmentent significativement avec l'épaisseur du biofilm. Quant au Mn, il est surtout présent sur les premières couches de colonisation par les bactéries mis en évidence par cartographie par élément (EDX).

Parallèlement, de nombreux dénombrements d'algues, de cyanobactéries et de diatomées ont été effectués dans les eaux et les biofilms en pilote. Les résultats obtenus ont indiqué des différences entre la composition de l'eau et celle du biofilm. En effet, dans l'eau, les conditions sont favorables aux développements des cyanobactéries et des algues dont les proportions augmentent après passage dans le pilote. Les cyanobactéries représentent parfois plus de 50 % des « espèces » dans l'eau alors que ces dernières ne représentent relativement que 20 % environ par rapport aux autres « Taxons » contenues dans tous les biofilms, comme il est rencontré dans le milieu naturel.

Nous avons également étudié le comportement des différentes communautés de microorganismes contenues dans les eaux et les biofilms à l'aide des biologs GN2. Les communautés au sein des biofilms consomment (en relatif) surtout les acides carboxyliques et les composés aminés au niveau des biofilms élaborés dans le bioréacteur. Le comportement des communautés est différent selon les biofilms issus de bioréacteurs et les biofilms épiphytiques. Des différences sont aussi observées entre les eaux d'alimentations et de récupérations. En effet, les communautés consomment relativement plus les acides carboxyliques dans les eaux de récupérations que dans les eaux d'entrées. Les carbohydrates sont globalement et relativement plus utilisés par les communautés en entrée qu'en récupération. Toutefois, cela est dépendant des eaux étudiées.

L'ensemble de nos travaux a contribué à établir simultanément un diagnostic d'un milieu aquatique à l'échelle du bassin versant et a montré l'intérêt du biofilm dans l'épuration des eaux pour les perspectives de restauration du milieu. De plus, sur l'ensemble de ces espèces végétales, trois se sont avérées intéressantes pour envisager de les utiliser pour l'épuration : *Juncus effusus*, *Phalaris arundinacea* et *Salix sp.* Notre étude a montré que ces espèces persistent au cours temps *in situ*. L'aménagement de végétaux dans le milieu naturel conduira certainement à des modifications des habitats du site. Néanmoins, en respectant la phytosociologie et la répartition des végétaux, l'impact des transformations devrait être moins important d'où l'intérêt d'utiliser des espèces autochtones pour l'épuration et de bien connaître le milieu.

Le biofilm naturel apparaît comme une « architecture » très complexe mais par là-même très riche en informations avec des spécificités liées à chaque station étudiée. Contrairement aux analyses d'eaux qui sont trop ponctuelles, les biofilms épiphytiques en tant que produit des variations d'une eau qui a évolué au cours du temps, pourraient permettre un meilleur diagnostic d'un milieu donné et mettre en avant le biofilm comme un **bioindicateur** au même titre que les diatomées, mais le biofilm serait un indice plus large que l'IBD. Tous ces résultats laissent supposer que le biofilm apparaît comme un marqueur du milieu naturel que l'on pourrait attribuer à une qualité d'eau. Cependant, il faut poursuivre les études de caractérisation des biofilms sur le terrain et aussi en laboratoire pour renforcer les résultats préliminaires obtenus au cours de ces travaux qui sont plutôt encourageants.

PERSPECTIVES

Des solutions d'aménagement des zones tampons par des végétaux autochtones peuvent être envisagées sur ces zones de rejets à l'échelle du BV pour limiter les apports en P et MO dans le lac de Ribou.

- Pour cela, l'étude des capacités épuratoires des végétaux sélectionnés lors des inventaires à partir d'une « station écologique de type lagune » *in situ*, est essentielle pour évaluer l'épuration des eaux du BV par les plantes (*Juncus effusus*, *Phalaris arundinacea*, *Salix sp.*).

- Parallèlement, les bioréacteurs à biofilms en laboratoire sont de bons outils demandant peu d'investissement, pour évaluer les capacités épuratoires vis-à-vis d'un polluant donné comme un pesticide, les nitrates, le P, les métaux. Par conséquent, un pesticide pourrait très bien être transformé en composé plus nocif que la molécule initiale mais neutralisé efficacement par sa biodégradation par les biofilms naturels. Des études préliminaires réalisées en laboratoire grâce à de nouveaux bioréacteurs à biofilms ont montré la faisabilité de cette approche « traitement » pour le cuivre, le paranitrophénol et les nitrates. Ces travaux sont à poursuivre pour différents biofilms et différents polluants telles les cyanotoxines.

- L'approche sur le diagnostic doit être poursuivie sur l'ensemble du BV du Ribou avec une étude plus détaillée des espèces d'algues, de diatomées et de bactéries présentes dans les biofilms épiphytiques et sur supports artificiels. Cette approche permettra d'obtenir une analyse plus fine du milieu et des conséquences de l'anthropisation, mais également sera un outil d'évaluation efficace pour le suivi de la restauration éventuelle du milieu. L'étude des biofilms benthiques reste à étudier avec la même méthodologie que pour les biofilms épiphytiques. Ainsi le biofilm comme bio-indicateur de la qualité des eaux pourra être avancé parmi les IBGN actuellement suivis.

- La poursuite de l'analyse des données physico-chimiques des eaux par ACP permettra de limiter le nombre d'analyses à effectuer et devrait contribuer à mettre en évidence des corrélations entre plusieurs paramètres physico-chimiques suivis sur plusieurs années et contribuer à la révélation de la restauration de la qualité des eaux de Ribou.

Références Bibliographiques

Aquascop. (2004) Phase 1 : état des lieux, diagnostic, *Plan de gestion captage du Ribou*, n°4635, document personnel de la Communauté d'Agglomération du Choletais.

Aquascop. (1998) étude de la ressource du lac de Ribou. document personnel de la Communauté d'Agglomération du Choletais.

Aiken. G.-R, Leenheer. J.-A. (1993) Isolation and chemical characterization of dissolved and colloidal organic carbon, *Chemistry and Ecology*, 8, pp 135-151.

Alleron. L., Merlet. N., Lacombe. C., Frère. J. (2008) Long-Term Survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable after monochloramine treatment, *Curr Microbiol* 57, pp 497-502.

Amiaud. B., Benizri. E. (2005) Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands, *Soil Biology and Biochemistry* 37 (11), pp 2055-2064.

Amir. S. (2005) Contribution à la valorisation de boues de stations d'épuration par compostage : devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost, *thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse*.

Aoustin. E., Schafer. A.-I., Fane. A.-G, Waite T.-D. (2001) Ultrafiltration of natural organic matter, *Separation and Purification Technology*, 22-23, pp 63-78.

Aparicio. I., Santos. J.L., Alonso. E. (2007) Simultaneous sonication-assisted extraction, and determination by gas chromatography-mass spectrometry, of di-(2-ethylhexyl)phthalate, nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and polychlorinated biphenyls in sludge from wastewater treatment plants, *Analytica Chimica Acta* 584, pp 455-461.

Babica. P., Blaha. L., Marsalek. B. (2005) Removal of microcystins by phototrophic biofilms, *Environ Science and Pollutants Research* 12 (6) pp 369-374.

Banfield. J. F., Hamers R. J. (1997) Processes at minerals and surfaces with relevance to microorganisms and prebiotic synthesis. In: Géomicrobiology: interactions between microbes and minerals, J. F. Banfield and Nealson K. H. (eds), *Rev. Mineral.*, 35, pp 81-122.

Benizri. E., Amiaud. B. (2005) Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands, *Soil Biology & Biochemistry* 37, pp 2055-2064.

Biber M.-V., Gülacar F.-O., Buffle J. (1996) Seasonal variations in principal groups of organic matter in eutrophic lake using pyrolysis GC-MS, *Environmental Science and Technology*, 30, p 3501- 3507.

Blanc. P., Corvi. C., Khim-Heang. S., Rapin. F. (1999) Evolution physico-chimique des eaux du Léman, *Rapport Comm. Int. Prot. Eaux Léman contre pollut.* Campagne 1998, p 33-59

Bouaicha. N. (2001) Risque pour la santé publique associé aux cyanotoxines en milieu d'eau douce, TSM n°9 – 96eme année.

Bourgues. S., Hart. B.T.H. (2007) Nitrogen removal capacity of wetland: sediment versus epiphytic biofilms, *Water Science and technology*, 55, 4, pp 175-182.

Bournerias. M. (1972) Flore et végétation du massif forestier de Rambouillet (Yvelines), *Cahiers des naturalistes (Bulletin des naturalistes parisiens)*, NS, 28 (2) pp 17-58.

Bournerias. M. (1979) Guide des groupements végétaux de la région parisienne (3^{ème} éd.). SEDES, Paris, 483 p.

Brown. D.-A., Sherriff. B.-L., Sawicki. J.-A., Sparling. R. (1999) Precipitation of iron minerals by a natural microbial consortium, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 63, pp 2163-2169.

Bruchet. A. (1985) Applications de la technique de pyrolyse GC-MS à l'étude des matières organiques non volatiles des eaux naturelles ou en cours de traitement, *Thèse de l'université de Poitiers*.

Bruchet. A., Rousseau. C., Malleville J. (1990) Pyrolysis GC-MS for investigating high molecular-weight THM precursors and other refractory organics, *Journal of the American Water Works Association*, 82 (9) pp 66-74.

CAC (Communauté d'Agglomération du Choletais) (2007) *Lettre de Bassin Versant*

Cai. T.M., Guan. L-B., Chen. L-W., Cai. S., Li. X-D., Cui. Z-L., Li. S-P. (2007) Enhanced Biological Phosphorus removal with *Pseudomonas putida* GM6 from activated sludge, *Pedosphere* 17 (5) 624-629.

Carlson. G., Silverstein. J. (1994) Biofilm sorption of natural organic material *National Conference on Environmental Engineering* 1994, pp 460-466.

Carlson. G., Silverstein. J. (1998) Effect of molecular size and charge on biofilm sorption of organic matter, *Water Research*, 32 (5) pp 1580-1592.

Charbonneau. M., (2002) Evaluation des risques présentés par la microcystines-LR dans l'eau potable : étude de l'oncogénèse hépatique chez le rat, Conférence nationale de recherche sur les substances toxiques, Crowne Plaza, Ottawa.

Charlet. L. (2004) Ressources et qualité/ Intro/ DDS-TUE365/3, *Cours Pollutions et Epurations*, Université de Grenoble.

Chen. J., Gu. B., Leboeuf E.-E., Pan. H., Dai. S. (2002) Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions, *Chemosphere*, 48, pp 59-68.

Chen. G., Kagwade. S.-V., French. G.-E., Ford. T. E., Mitchell. R., Clayton. C.R. (1996) Metal ion and exopolymer interaction: a surface analytical study, *Corrosion*, 52, pp 891-899.

Cheng. J., Landesman. L., Bergmann. B.A., Classen. J.J., Howard. J.W., Yamamoto. Y.T. (2002) Nutrient removal from swine lagoon liquid by *Lemna minor* 8627, *Transactions of the American Society Agricultural Engineers* 45 (4) pp 1003-1020

Cheverry. C., Robert. M. (1998) La dégradation des sols irrigués et de la ressource en eau : une menace pour l'avenir de l'agriculture et pour l'environnement des pays au sud de la Méditerranée ?, *Etude et gestion des sols* 5 (4) pp 217-226.

CIPEL. (2004) *La lettre du Léman. Bulletin d'information*, 27, Lausanne

CIPEL. (2006) *La lettre du Léman. Bulletin d'information*, 31, Lausanne

CNRS.(2006) <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doseau/decouv/ecosyst/eutrophisat.html>

Coble. P.-G. (1996) Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy, *Marine Chemistry*, 51, pp 325-346.

Comeau. Y. (1997) Procédés et conception de filière de déphosphatation biologique – La déphosphatation des eaux usées, *Journées internationales d'études des eaux*, Palais des congrès, Cebedeau, Liège, 167 p.

Comeau. Y., Brisson. J., Chazarenc. F. (2006) Traitement de boues piscicoles par marais artificiel et lit filtrant de déphosphatation, société de recherche et de développement en aquaculture continentale INC.

Cornell. R. M., Schwertmann. U. (1996) The iron oxides. Structure, Properties, reactions, occurrence and uses, VCH, New York, 573 p.

Coyne et Béliet. (1994) Etude hydrologique des flux du lac de Ribou, rapport, Paris

Croué. J.-P. (1999) Natural organic matter : structural characteristics and reactive properties, Formation and control of disinfection by-products in drinking water, Editions SINGER P.C., *American Water Works Association*.

Croué. J.P., Bruchet. A., Hwang. C., Leenheer. J. (2001) The use of pyrolysis-GC-MS as a single analytical tool for the structural characterization of NOM and identification of DBP precursor sites, *Proceedings WQTC*.

Davidson. W. et Seed. G. (1983) The kinetics of the oxidation of ferrous iron in synthetic and natural waters. *Geochimica and Cosmochimica Acta* (47) pp 67-79.

Demeusy. A. (2007) Méthodologie d'étude des matières organiques dissoutes dans les eaux destinées à la consommation (du bassin versant à la station de potabilisation) : Application au bassin versant du Cébron, *Thèse de l'université de Poitiers*.

De Nardi. F. (2007) 2^{ème} Rapport d'activité, *Communauté d'Agglomération du Choletais*. 80 p

Dorioz. J.M et Aurousseau. P (2007) Le Phosphore dans l'environnement : bilan des connaissances sur les impacts, les transferts et la gestion environnementale, *Océanis* 33, n°1/2, 331p

Dorioz. J.M., Trévisan. D., Vansteelant. J.Y. (2007) Transferts diffus de phosphore des bassins versants agricoles vers les lacs : impacts, ordre de grandeur, mécanismes. *L'eau dans l'espace rural-production végétale et qualité de l'eau*, INRA édition., pp 249-264

Dorioz. J.-M., Wang. D., Poulenard. J., Trévisan. D. (2006) The effect of grass buffer strips on phosphorus dynamics ; a critical review and synthesis as a basis for application in agricultural landscapes in France. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 117, pp 4-21.

Duchaufour. P. (2001) Introduction à la science du sol – Sol, végétation, environnement, *édition DUNOD*

Eriksson. P. (2001) Interaction effects of flow velocity and oxygen metabolism on nitrification and denitrification in biofilms on submersed macrophytes, *Biogeochemistry*, 55, pp 29-44.

Escher. A., Characklis. W.G. (1990) Modeling the initial events in biofilm accumulation, *Biofilms*, pp 445-486.

Eskandarpour. A., Sassa. K., Bando. Y., Okido. M., Iwai. K., Asai. S. (2007) Semi-continuous magnetic removal of phosphate using an iron oxide hydroxide adsorbent and regeneration of its adsorbent, *ISIJ International* 47 (4) pp 563-567.

Fitter. R., Fitter. A. Blamey. M. (2005) Guide des fleurs sauvages (7ème éd.). *Les guides du Naturaliste*. Delachaux et Niestlé, Paris, 352 p.

Flemming. H.-C., Neu. T.R., Wozniak. D. J. (2007) The EPS matrix: The house of biofilm cells, *Journal of bacteriology* 189 (22) pp 7945-7947.

Forêt. C., Merlet. N., Tribollet. B., Chaussec. G., Legube. B. (2006) Détermination électrochimique de l'épaisseur des biofilms dans les circuits d'eau, *Matériaux et Techniques* 94, pp 467-476.

Gagnon. V., Chazarenc. F., Comeau. Y., Brisson. J. (2007) Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands, *Water Science and Technology* 56 (3) pp 249-254.

Gamby. J., Pailleret. A., Boucher clodic. Carol., Pradier. C.-M., Tribollet. B. (2008) In situ detection and characterization of potable water biofilms on materials by microscopic, spectroscopic and electrochemistry methods, *Electrochimica Acta* 54, pp 66-73.

Gassani. J. (2008) Apport de l'analyse spatiale à l'étude du rôle des dépressions dans la dynamique hydrologique d'un bassin versant en milieu nord-sahélien - le cas du lac de Mâle (Brakna Mauritanie), *Thèse de doctorat*, Université d'Angers.

Gauthier C. (2003) Contribution à l'étude du fractionnement de l'aluminium libéré dans des solutions de sols forestiers : influence de la quantité et de la nature de la matière organique *Thèse de doctorat*, Université de Limoges.

Gauthier. M., Martin. Y., Lelong. P., Breittmayer. V. (1984) interactions entre les bactéries et les algues dans une culture continue de phytoplancton naturel soumise aux conditions extérieures, *GERBAM, deuxième colloque international de bactériologie marine*, 1-5 octobre, Brest.

Germain. H. (1981) Flore des diatomées ; eaux douces et saumâtres du Massif Armoricaïn et des contrées voisines d'Europe occidentale, édition Boubée

Gold. C. (2002) Etude des effets de la pollution métallique (Cd/Zn) sur la structure des communautés de diatomées périphériques des cours d'eau. Approches expérimentales in situ et en laboratoire, *thèse de l'université de bordeaux 1*.

Gold. C., Feurtet-Mazel. A., Coste. M., Boudou. A. (2002) Field transfert of periphytic diatom communities to assess short-term structural effects of metals (Cd, Zn) in rivers, *Water Research* 36, pp 3654-3664.

Grasmück. N., Haury. J., Léglize. L., and Muller. S. (1995) Assessment of the bio-indicator capacity of aquatic macrophytes using multivariate analysis, *Hydrobiologia*, 300-301, pp 115-122.

Gristina. (1987) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration, *Science* (New York, N.Y.), 237, p 4822.

Günther. S., Trutnau. M., Kleinsteuber. S., Hause. G., Bley. T., Röske. I., Harms. H., Müller. S. (2009) Dynamics of Polyphosphate-Accumulating Bacteria in Wastewater Treatment Plant Microbial Communities Detected via DAPI and Tetracycline Labelling, *Applied and Environmental Microbiology* 75 (1) pp 2111-212.

Gustafsson. J.P., Renman. A., Renman. G., Poll. K. (2008) Phosphate removal by mineral-based sorbents used in filters for small-scale wastewater treatment, *Water research* 42, pp 189-197.

Haglund. A.-L., Törnblom. E., Boström. B., Tranvik. L. (2002) Large differences in the fraction of active bacteria in plankton, sediments, and biofilm, *microbial ecology* 43, pp 232-241.

Hansel. M. C., Fendorf. S., Sutton. S., Newville. M. (2001) Characterization of Fe Plaque and Associated Metals on the Roots of Mine-Waste Impacted Aquatic Plants, *Environ. Sci. Technol.* 35, pp 3863-3868.

Haury. J., Peltre. M.C., Trémolières. M., Barbe. J., Thiebaut. G., Bernez. I., Daniel. H., Chatenet. P., Haan-Archipof. G., Muller. S., Dutartre. A., Laplace-Treyture. C., Cazaubon. A., Lambert-Servien. E. (2006) A new method to assess water trophic and organic pollution: the Macrophyte Biological Index for Rivers (IBMR) - Application to different types of rivers and pollutions, *Hydrobiologia* 570, pp 153-158.

Hertkorn. N., Claus. H., Schmitt-Kopplin. Ph., Perdue. E.-M., Filip. Z. (2002) Utilization and Transformation of Aquatic Humic Substances by Autochthonous Microorganisms, *Environmental Science and Technology* 36 (20) pp 4334-4345.

Hiernaux. P. (2005) Contribution de la fraction minérale des eaux au développement et à la structure des biofilms: Apport des méthodes microscopiques et spectroscopiques, *Thèse de l'université de Poitiers*.

Horppila. J. et Nurminen. L. (2003) Effects of submerged macrophytes on sediment resuspension and internal phosphorus loading in Lake Hiidenvesi (southern Finland). *Water Research* 37, pp 4468-4474.

Humbert. H. (2006) Etude de la sorption des matières organiques naturelles par les résines échangeuses d'ions : intérêt pour la production d'eau potable, *Thèse de l'université de Poitiers*.

James. C., Fisher. J., Russel. V., Collings. S. et Moss. B. (2005) Nitrate availability and hydrophyte species richness in shallow lakes. *Freshwater Biology* 50, pp 1049-1063.

Jöbgen. A. M., Palm. A., Melkonian. M. (2004) Phosphorus removal from eutrophic lakes using periphyton on submerged artificial substrata, *Hydrobiologia*, 528, pp 123-142.

Kao. J.T., Titus. J.E., Zhu, W.-X. (2003) Differential nitrogen and phosphorus retention by five wetland plant species, *Wetlands* 23 (4) pp 979-987

Karathanasis. A.D., Potter. C.L., Coyne. M.S. (2003) Vegetation effects on fecal bacteria, BOD, and suspended solid removal in constructed wetlands treating domestic wastewater, *Ecological Engineering* 20, pp 157-169.

Keevil. C. W. (1999) Pathogens and metabolites associated with biofilms, *Special Publication - Royal Society of Chemistry Biofilms in the Aquatic Environment* 242, pp 145-152.

Koottatep. T., Polprasert. C. (2003) Case study on constructed wetlands for treatment of wastewater from an industrial estate in the tropics. *In IWA Specialist Group on The use of macrophytes in water pollution control, Newsletter No. 27*, pp. 4-8.

Korner. S., Vermaat. J. E. (1998) The relative importance of *Lemna Gibba* L., bacteria and algae for the nitrogen and phosphorus removal in duckweed-covered domestic wastewater, *Wat. Res.* 32 (12) pp 3651-3661

Korner. S., Vermaat. J. E., Veenstra. S. (2003) The capacity of Duckweed to Treat Wastewater. *Journal of Environmental Quality* 32, pp 1577-1582

Kosińska. K. et Miśkiewicz. T. (2009) Performance of an anaerobic bioreactor with biomass recycling, continuously removing COD and sulphate from industrial wastes, *Bioresource Technology*, 100, (1) pp 86-90

Kulkarni M., Chaudhari A. (2007) Microbial remediation of nitro-aromatic compounds : An overview, *Journal of Environmental Management* 85, pp 496-512

Labanowski. J. (2004) Matière organique naturelle et anthropique : vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation, *Thèse de l'université de limoges*.

Laby. F. (2006) Pollution de l'eau, <http://actuenvironnement.com/ae/news/2072.php4>
consulté le 31/07/08.

Lacoste. A. et Salanon. R. (1999) *Eléments de Biogéographie et d'Ecologie*. 2ème édition. Fac. Géographie, NATHAN Université, Paris, 300 p.

Lacoul. P. et Freedman. B. (2006) Environmental influences on aquatic plants in freshwater ecosystems, *Environ. Rev.* 14 (2) pp 89-136.

Lan. Y.Z., Zhang. S., Wang. J.K, Smith. R.W. (2006) Phosphorus removal using steel slag, *Acta metal. Sin* 19 (6) pp 449-454.

Lawrence. J.R., Zhu. B., Swerhone. G.D.W., Roy. J., Wassenaar. L.I., Topp. E., Korber D.R. (2009) Comparative microscale analysis of effects of triclosan and triclocarbon on the structure and function of river biofilm communities, *Science of the Total Environment* 407, pp 3307-3316.

Leenheer. J.A. (1981) Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters, *Environ. Sci. Technol.* 15, pp 578-587.

Leenheer. J.-A., Croué. J.-P. (2003) Characterizing aquatic dissolved organic matter, *Environmental Science and Technology* 37 (1) pp 18A-26A.

Legendre. L., Courties. C., Trousselier. M. (2001) Flow cytometry in oceanography 1989-1999 : Environmental challenges and research trends, *Cytometry* 44 (3) pp 164-172.

Levi. Y. (2007) Evaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives, AFSSA-AFSSET, groupe de travail : cyanobactéries et cyanotoxines, Nancy, 227 p.

Lin.Y-F., Jing. S-R., Wang. T-W., Lee. D-Y. (2002) Effects of macrophytes and external carbon sources on nitrate removal from groundwater in constructed wetlands, *Environmental Pollution* 119, pp 413-420.

Lodé T.(2007) La guerre des sexes chez les animaux, *odile Jacob*, 300 p

Mann. C. J. & Wetzel. R.G. (2000) Effects of the emergent macrophyte *Juncus effusus* L. on the chemical composition of interstitial water and bacterial productivity, *Biochemistry* 48, pp 307-322.

Martin. B. (1995) La matière organique naturelle dissoute des eaux de surfaces: fractionnement, caractérisation et réactivité, *Thèse de l'université de Poitiers*.

Martin-Mousset. B., Croué. J.-P., Lefebvre. E., Legube. B. (1997) Distribution and characterization of dissolved organic matter of surface waters, *Water Research*, 31 (3) pp 541-553.

Mayer. C., Moritz. R., Kirschner. C., Borchard. W., Maibaum. R., Wingender. J., Flemming. H.-C. (1999) The role of molecular interactions : studies on model systems for bacterial biofilms, *International Journal of Biological Macromolecules*, 26, pp 3-16.

Melzer. A. (1999) Aquatic macrophytes as tools for lake management. *Hydrobiologia* 395/396, pp 181-190.

Meyer. G., Schneider-Merck. T., Böhme. S., Sand. W. (2002) A simple method for investigations on the chemotaxis of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Desulfovibrio vulgaris*, *Acta Biotechnology* 22 (3-4) pp 391-399

Miletti. T.E., Carlyle. C.N., Picard. C.R., Mulac. K.M., Landaw. A., Fraser. L. (2005) Hydrology, Water Chemistry, and Vegetation Characteristics of a Tamarack Bog in Bath Township, Ohio : Towards Restoration and Enhancement, *Ohio J Sci* 105 (2) pp 21-30

Miquel G. (2003) La qualité de l'eau et de l'assainissement en France, *Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques*, Rapport, p 61-103

Miyata. N., Sugiyama. D., Tani. Y., Tsuno. H., Seyama. H., Sakata. M., Iwahori. K., (2007) Production of biogenic manganese oxides by repeated cultures of laboratory microcosms, *Journal of bioscience and bioengineering* 103 (5) pp 432-439.

Moon. Y. H., Kim. J.G., Ahn. J. S., Lee. G.H., Moon. H.S. (2007) Phosphate removal using sludge from fuller's earth production, *Journal of Hazardous Materials* 143, pp 41-48.

Morel. M., Rumeau. M., Pontié. M. (1994b) Tribune de l'eau, 571/5, pp 31-38.

Morel M., Rumeau. M., Pontie. M., Ali. A., Dieye. A., Mar diop. C. (1994a) Nouveaux procédés économiques de désinfection et de dessalement des eaux, Tribune de l'eau 571 (5).

Morin, S., Duong, T.T. , Dabrin, A., Coynel, A., Herlory. O., Baudrimont. M., Delmas. F., Durrieu. G., Schäfer. J., Winterton. P., Blanc, G., Coste, M. (2008) Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France, *Environmental Pollution* 151 (3) pp 532-542

Mounier. S., Patel. N., Quilici. L., Benaim. J.-Y., Benamou. C. (1999) Fluorescence 3D de la matière organique dissoute du fleuve Amazone, *Water research*, 33 (6) pp 1523-1533

Muelstein. L.K., Porter. D., Short. F.T. (1991) *Labyrinthula zosterae* sp. nov., the causative agent of wasting disease of eelgrass, *Zostera marina*. *Mycology*, 83, pp 180-191.

Mulhauser. B. et Monnier. G. (1995) Guide de la Faune et de la Flore des Lacs et Etangs d'Europe. Delachaux et Niestlé, Lausanne-Paris, 336 p.

Murray. K.J., Mozafarzadeh. M.L., Tebo. B.M. (2005) Cr(III) oxidation and Cr toxicity in cultures of the manganese (II)-oxidizing *Pseudomonas putida* strain GB-1. *Geomicrobial. J.* 22, pp 151-159.

Neveu. A., Rion. C., Bonhomme. R., Chassin. P., Papy. F. (2001) L'eau dans l'espace rural, vie et milieux aquatiques, *INRA edition*, Paris, 282 p.

Nielsen. P.H., Jahn. A., Palmgren. R. (1997) Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms, *Water Science and Technology*, 36 (1), p 11-19.

Öbek. E., Hasar. H. (2002) Role of duckweed (*Lemna minor* L.) harvesting in biological phosphate removal from secondary treatment effluents, *Fresenius Environmental Bulletin*, 11, (1) pp 27-29.

Ochoa. J-C., Coufort. C., Escudié. R., Liné. A., Paul. E. (2007) Influence of non-uniform distribution of shear stress on aerobic biofilms, *Chemical Engineering Science* 62, pp 3672-3684

Ouellet-Plamondon. C., Brisson. C., J., Comeau. Y. (2004) Effect of Macrophyte Species on Subsurface Flow Wetland Performance in Cold Climate, *Proceedings of the American Society of Agricultural Engineers*.

Ouellet-Plamondon. Chazarenc. F., C.M., Brisson. J., Comeau. Y. (2006) Artificial aeration to increase pollutant removal efficiency of constructed wetlands in cold climate, *Ecological Engineering* 27, pp 258-264.

Oueslati. M.A., Haddad. M., Blake. G. (1999) Elimination of phenol by two aquatic plants: *Juncus fontanesii* and *Lemna minor* .L, *Revue des sciences de l'eau* 11 (4) pp 555-568

Parinet. B., Lhote. A., Legube. B. (2004) Principal component analysis: an appropriate tool for water quality evaluation and management- Application to a tropical lake system, *Ecological Modelling* 178, pp 295-311

Parlanti. E., Worz. K., Lamotte. G.M., 2000, Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs, *Organic Geochemistry* 31, p 1765-1781.

Paul. E. et Queinnec (2008) SFGP, 10^{ème} Journées Cathala-Letort, Toulouse, 1 et 2 octobre.

Pellerin. F., Pellerin. S., Vilette. C., Boiffin. J. (2000) Evolution du raisonnement de la fertilisation phosphate des grandes cultures. Etude et gestion des sols, 7 (1), pp 53 – 71.

Penning. E., Mjelde. M., Dudley. B., Hellsten. S., Hanganu. J., Kolada. A., van den Berg. M., Poikane. S., Phillips. G., Willby. N., Ecke. F. (2008) Classifying aquatic macrophytes as indicators of eutrophication in European lakes, *Aquatic Ecology*, In: Multidisciplinary Journal Relating to Processes and Structures at Different Organizational Levels

Perttu. K. & Kowalik. P. J. (1997) Salix vegetation filters for purification of waters and soils. *Biomass and Bioenergy* 12, pp 9-19

Peyton, B.M. (1996) Effects of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density. *Water Research* 30 (1), pp 29-36

Picard. C. R., Fraser. L. H. et Steer. D. (2005) The interacting effects of temperature and plant community type on nutrient removal in wetland microcosms. *Bioresource Technology* 96, pp 1039-1047.

Piccolo. A. (2001) The supramolecular structure of humic substances, *Soil Science*, 166 (11) pp 810-832.

Pietrasanta.Y. et Bondon. D. (1994) Le lagunage écologique. Poche environnement. Economica, Paris, 112 p.

Pipalova. I. (2002) Initial impact of low stocking density of grass carp on aquatic macrophytes, *Aquatic Botany*, 73, pp 9-18.

Prygiel. J., Leveque. L., Iserentant. R. (1996) A new Practical Diatom index for the assessment of water quality in monitoring networks *Revue des Sciences de l'Eau* 9 (1), pp 97-113.

Pulford. I. D. et Watson. C. (2003) Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees – a review. *Environment International* 29, pp 529-540

Quintelas. C., Rocha. Z., Silva. B., Fonseca. B., Figueiredo. H., Tavares. T. (2009) Removal of Cd(II), Cr(VI), Fe(III) and Ni(II) from aqueous solutions by an E. coli biofilm supported on Kaolin, *Chemical Engineering Journal* 149, pp 319-324.

Quintelas. C., Fonseca. B., Silva. B., Figueiredo. H., Tavares. T. (2009) Treatment of chromium(VI) solutions in a pilot-scale bioreactor through a biofilm of *Arthrobacter viscosus* supported on GAC, *Bioresource Technology*, 100(1), pp 220-226

Rahman. N.K., Abu Bakar. M.Z., Uzir. M.H., Kamaruddin. H. A. (2009) Modelling on the effect of diffusive and convective substrate transport for biofilm, *Mathematical Biosciences* 218, pp 130-137.

Ramasamy, P., Zhang, X. (2005) Effects of shear stress on the secretion of extracellular polymeric substances in biofilms. *Water Science and Technology* 52 (7), pp 217- 223

Rebillard. J.P., Torre. M. (1993) Bacterial enumeration with the DAPI-INT coupled method: application to a concrete case, *Revue des Sciences de l'Eau* 6 (2) pp 153-174.

Rittmann, B.E. (1982). The effect of shear stress on biofilm loss rate. *Biotechnology and bioengineering* 24 (2), pp 501-506

Roldan. M., Hernandez-Mariné. M. (2009) Exploring the secrets of the three-dimensional architecture of phototrophic biofilms in caves, *International Journal of Speleology* 38, pp 41-53.

Rusznayak. A., Vladar. P., Molnar. P., Reskone. M.N., Kiss. G., Marialigeti. K., Borsodi. A. (2008) Cultivable bacterial composition and Biolog catabolic diversity of biofilm communities developed on *Phragmites australis*, *Aquatic Botany* 88, pp 211-218.

Rumpel. C., Kogel-knabner. I. (2002) The role of lignite in the carbon cycle of lignite containing mine soils: evidence from carbon mineralisation and humic acid extraction, *organic geochemistry* 33, pp 393-399.

Sabater. S., Buchaca. T., Cambra. J., Catalan. J., Guasch. H., Ivorra. N., Munoz. Isabel., Navarro. E., Real. M., Romani. A. (2003) Structure and function of benthic algal communities in an extremely acid river. *Journal of Phycology* 39 (3) pp 481-489.

Sabater. S., Armengol. J., Comas. E., Sabater. F., Urrizalqui. I., Urrutia. I. (2000) Algal biomass in a disturbed Atlantic river: water quality relationships and environmental implications. *Science of the Total Environment* 263 (1-3) pp 185-195.

Saint-Maxent. T. (2002) Les espèces animales et végétales susceptibles de proliférer dans les milieux aquatiques et subaquatiques, Jeu de fiches descriptives des espèces végétales. *Rapport de DESS*, pp 110 à 134.

Saiz-jimenez. C. (1994) Analytical Pyrolysis of Humic Substances : Pitfall, Limitations and Possible Solutions, *Environ.Sci. Technol* 28, pp 1773-1780

Sbaï. M., Essis-Tome. H., Gombert. U., Breton. T., Pontie. M. (2007) Electrochemical stripping analysis of methyl-parathion (MPT) using carbon fiber microelectrodes (CFME) modified with combinations of poly-NiTSPc and Nafion films, *Sensors and Actuators B* ,124, pp 368-375

SDAGE. (1996) Annexe du Schéma Directeur d'Aménagement et de Gestion des eaux du bassin Loire-Bretagne. Etat de la connaissance et des lieux. SOFIC, Tours, p 54.

Senesi. N., Miano. T.-M., Provenzano. M.-R., Brunetti. G. (1991) Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy, *Soil Science* 152, pp 259-271.

Seo. D.C., Cho. S.J., Lee. H.J., Heo. J.O. (2005) Phosphorus retention capacity of filter media for estimating the longevity of constructed wetland, *Water Research* 39, pp 2445-2457.

Sigg. L., Behra. P., Stumm. W. (2000) Chimie des milieux aquatiques : chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement, 3^{eme} édition DUNOD, 567 p.

Simonet F. (2001) Le système d'évaluation de la qualité de l'eau des rivières : le SEQ-Eau, *Revue de l'agence de l'eau Adour-Garonne*, Hiver n°81, p 7-9.

Sondergaard M. et Jeppesen E (2007) *Anthropogenic impacts on lake and stream ecosystems, and approaches to restoration*, Journal of Applied Ecology 44 , pp 1089-1094.

Stedmon. C.-A., Markager. S., Bro. R. (2003) Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy, *Marine Chemistry* 82, pp 239-254.

Steinmann. C. R, Weinhart. S., Melzer A. (2003) *A combined system of lagoon and constructed wetland for an effective wastewater treatment*, Water Research 37 pp 2035-2042.

Tani. Y., Miyata. M., Ohashi. M., Ohnuki. T., Seyama. H., Iwahori. K., Soma. M. (2004) Interaction of inorganic arsenic with biogenic manganese oxide produced by a Mn-oxidizing fungus, strain KR21-2, *Environ. Sci. Technol.* 38, pp 6618-6624.

Tapsoba. I., Bourhis. S., Feng. T., Pontie. M. (2009) Sensitive and selective electrochemical analysis of methyl-parathion (MPT) and 4 nitrophenol (PNP) by a new type p-NiTSPc/p-PPD coated carbon fiber microelectrode (CFME) *Electroanalysis* (soumis).

Thorén A-K. (2007) Urea transformation of wetland microbial communities, *Microbial ecology* 53 (2) pp 221-232.

Thurman E.-M., Malcolm R.-L. (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances, *Environment Science and technology* 15, pp 463-466.

Tissaux. J-C. (1996) Une revue bibliographique des principaux mécanismes pédogénétiques pour caractériser le rôle du bois raméal fragmenté (BRF) dans le processus d'humidification, Mémoire de fin d'étude, Université Laval, Quebec

Uysal. Y., Zeren. O. (2004) Removal efficiencies of nutrients from wastewater treated with duckweed (*Lemna minor L.*), *Fresenius Environmental Bulletin* 13 (4) pp 1016-1019.

Vancampenhout. K., Wouters. K., De Vos. B., Buurman. P., Swennen. R., Deckers. J. (2009) Differences in chemical composition of soil organic matter in natural ecosystems from different climatic regions – A pyrolysis-GC-MS study, *Soil Biology and biochemistry* 41, pp 568-579.

Van oostrom. A.J. (1995) Nitrogen removal in constructed wetlands treating nitrified meat processing effluent. *Water Science and Technology* 32 (3) pp 137–147.

Vasudevan. S., Sozhan. G., Ravichandran. S., Jayaraj. J., Lakshmi. J., Sheela. S.-M. (2008) Studies on the removal of phosphate from drinking water by electrocoagulation process, *Ind. Eng. Chem. Res.* 47, pp 2018-2023.

Varjo. E., Liikanen. A., Salonen. V-P., Martikainen P.J. (2003) A new gypsum-based technique to reduce methane and phosphorus release from sediments of eutrophied lakes, *Water Research* 37, pp 1-10.

Verveake. P., Luyssaert. S. (2003) Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial. *Environment Pollution* 126 pp 275-282.

Violleau. D. (1999) Intérêt du fractionnement et de l'extraction des matières organiques naturelles d'eaux de surface pour l'étude de leur pouvoir complexant vis-à-vis du cuivre, *Thèse de l'université de Poitiers*.

Webb S.M., Dick. G.J., Bargar J.R., Tebo. B.M. (2005) Evidence for the presence of Mn(III) intermediates in the bacterial oxidation of Mn(II) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (15), pp 5558-5563.

Weishaard. J.-L., Aiken G.-R., Bergamaschi B.-A., Fram. M.-S., Fujii. R., Mopper. K. (2003) Evaluation of specific ultraviolet absorbance as a indicator of the chemical composition and the reactivity of dissolved organic carbon, *Environment Science and Technology* 37, pp 4702-4708.

Weiss. J.V., Emerson. D., Megonigal. J. P. (2005) Rhizosphere Iron (III) deposition and Reduction in a *Juncus effusus* L.-Dominated Wetland, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 69, pp 1861-1970.

Widrig. D.-L., Gray. K.-A., McAuliffe. K.-S. (1996) Removal of algal-derived organic material by preozonation and coagulation : monitoring changes in organic quality by pyrolysis GC-MS, *Water research* 30 (11) pp 2621-2632.

Yan. J., Kirk. D.-W., Jia. C.-Q., Liu. X. (2007) Sorption of aqueous phosphorus onto bituminous and lignitous coal ashes, *Journal of Hazardous Materials* 148, pp 395-401.

Zhang. J., Sun. Y., Chang. Q., Liu. X., Meng. G. (2006a) Improvement of crossflow microfiltration performances for treatment of phosphorus-containing wastewater, *Desalination* 194, pp 182-191.

Zhang. B.-H., Wu. D.-Y., Wang. C., HE. S.-B., Zhang. Z.-J., Kong. H.-N. (2006b) Simultaneous removal of ammonium and phosphate by zeolite synthesized from coal fly ash as influenced by acide treatment, *Journal of Environmental Sciences* 19, pp 540-545.

Webographie :

Web 1 <http://fr.wikipedia.org/wiki/Polluant>

Web 2 <http://www.bretagne-environnement.org/membres/matiereorganique/index.php/La-matiere-organique-dans-les-eaux-continentales-bretonnes.html>

Web 3 <http://www.ecologie.gouv.fr/IMG/pdf/F7eapots.pdf>

Web 4 <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Microcystine.jpg>

Web 5 <http://www.humet.hu/141-klinika-fre.pdf>

Web 6 http://www.agriculture.gouv.fr/spip/IMG/pdf/50647_01-1.pdf

Web 7 http://www.ifremer.fr/ic/fr/biofilm/Schema_Biofilm.JPG

Web 8 <http://www.membres.lycos.fr/regiscourteille/cours/ch4.htm>

Annexes

Annexe 1 : Données physico-chimiques issues des stations ZB, TR et AV utilisées pour l'ACP

| | Dates | Stations | Température (T°C) | Oxygène dissous (mg/L) | % saturation | Conductivité (µS/cm) | pH | Chlo a (µg/L) | KMnO4 (mg/L) | Nitrates (mg/L) | NH4+ (mg/L) | Azote kjeldahl (mg/L) | Phosphates (mg/L) | Phosphore total (mg/L) | COT (mg/L) | COD (mg/L) | Fe (mg/L) | Mn (mg/L) |
|----|---------|----------|-------------------|------------------------|--------------|----------------------|------|---------------|--------------|-----------------|-------------|-----------------------|-------------------|------------------------|------------|------------|-----------|-----------|
| 1 | janv-00 | TR | 4,1 | 11,1 | 0,92079545 | 333 | 7,4 | | 8,2 | 28 | 0,138 | 1 | 0,32 | 0,3 | | | 0,39 | |
| 2 | janv-00 | AV | 4,7 | 13 | 1,09318182 | 270 | 7,9 | | 8,9 | 21 | 0,061 | 0,6 | 0,36 | 0,22 | | | 0,5 | |
| 3 | janv-00 | ZB | 4,6 | 12,6 | 1,05715909 | 263 | 7,6 | | 8,8 | 21 | 0,081 | 0,6 | 0,34 | 0,26 | | | 0,44 | |
| 4 | févr-00 | TR | 5,8 | 11,7 | 1,00823864 | 272 | 7,2 | | 6,6 | 22 | 0,131 | 1,9 | 0,19 | 0,22 | | | 0,73 | 0,04 |
| 5 | févr-00 | AV | 7,4 | 12,4 | 1,10613636 | 254 | 7,5 | | 7,6 | 20 | 0,066 | 0,9 | 0,29 | 0,16 | | | 0,44 | 0,04 |
| 6 | févr-00 | ZB | 7,8 | 11,2 | 1,00757576 | 238 | 7,4 | | 8,15 | 17 | 0,167 | 0,9 | 0,26 | 0,17 | | | 0,95 | 0,05 |
| 7 | mars-00 | TR | 8,8 | 10,1 | 0,92774621 | 315 | 7,7 | | 7,6 | 18 | 0,14 | 0,9 | 0,05 | 0,28 | | | 0,57 | 0,05 |
| 8 | mars-00 | AV | 9,8 | 11,3 | 1,059375 | 280 | 8 | | 7,6 | 20 | 0,009 | 0,7 | 0,2 | 0,17 | | | 0,46 | 0,05 |
| 9 | mars-00 | ZB | 9,8 | 11,7 | 1,086875 | 248 | 7,9 | | 10,8 | 17 | 0,12 | 0,7 | 0,08 | 0,12 | | | 0,38 | 0,06 |
| 10 | avr-00 | TR | 10,4 | 10,7 | 1,01528409 | 258 | 7,7 | | 9,15 | 8 | 0,227 | 0,7 | 0,14 | 0,15 | | | 1,05 | 0,05 |
| 11 | avr-00 | AV | 10,4 | 10,7 | 1,01528409 | 258 | 7,7 | | 6,9 | 8 | 0,098 | 1,4 | 0,12 | 0,09 | | | 0,42 | 0,04 |
| 12 | avr-00 | ZB | 10,6 | 10,1 | 0,96217803 | 253 | 8,9 | | 6,6 | 13 | 0,162 | 1,2 | 0,05 | 0,06 | | | 0,3 | 0,06 |
| 13 | mai-00 | TR | 15,2 | 8,5 | 0,88380882 | 284 | 7,7 | | 6 | 15 | 0,155 | 2,8 | 0,24 | 0,18 | | | 0,87 | 0,12 |
| 14 | mai-00 | AV | 14,8 | 10 | 1,03219897 | 255 | 8 | | 4,9 | 16 | 0,142 | 1 | 0,18 | 0,13 | | | 0,12 | 0,04 |
| 15 | mai-00 | ZB | 17,9 | 7,4 | 0,80727273 | 244 | 7,5 | | 6,3 | 12 | 0,133 | 1,9 | 0,16 | 0,17 | | | 0,57 | 0,07 |
| 16 | juin-00 | TR | 21,1 | 5,9 | 0,67939394 | 333 | 7,6 | | 10,4 | 3 | 0,153 | 2,5 | 0,14 | 0,35 | | | 0,57 | 0,31 |
| 17 | juin-00 | AV | 18,5 | 8,1 | 0,89284091 | 271 | 7,8 | | 10,6 | 12 | 0,141 | 1,2 | 0,07 | 0,1 | | | 0 | 0,04 |
| 18 | juin-00 | ZB | 22 | 7,9 | 0,92316388 | 266 | 8,9 | | 9,7 | 6 | 0,266 | 1,4 | 0,05 | 0,15 | | | 0 | 0,04 |
| 19 | juil-00 | TR | 19,2 | 5,4 | 0,80238636 | 365 | 6,74 | | 8,2 | 10,6 | 0,43 | 2,18 | 0,32 | 0,88 | | | 0,19 | 0,24 |
| 20 | juil-00 | AV | 19,6 | 8,7 | 0,97710227 | 291 | 8,1 | | 6,5 | 11,4 | 0,09 | 2,8 | 0,06 | 0,39 | | | 0,02 | 0,05 |
| 21 | juil-00 | ZB | 20 | 8,8 | 0,995 | 284 | 8,04 | | 7,4 | 7,3 | 0,3 | 1,57 | 0,2 | 0,87 | | | 0,04 | 0,06 |
| 22 | août-00 | TR | 25,9 | 9,8 | 1,21757576 | 336 | 8,6 | | 9,6 | 4 | 0,12 | 0,95 | 0,4 | 0,66 | | | 0,05 | 0,08 |
| 23 | août-00 | AV | 21,8 | 7,7 | 0,886875 | 294 | 9,3 | | 7,4 | 4,5 | 0,08 | 1,85 | 0,12 | 0,17 | | | 0,02 | 0,08 |
| 24 | août-00 | ZB | 23 | 6,8 | 0,8075 | 294 | 8,79 | | 7,4 | 7 | 0,13 | 1,85 | 0,09 | 0,16 | | | 0,02 | 0,05 |
| 25 | sept-00 | TR | 15,2 | 4 | 0,41690909 | 264 | 7,05 | | 11,2 | 3 | 0,34 | 5,49 | 1,35 | 2,29 | | | 0,22 | 0,14 |
| 26 | sept-00 | AV | 17,3 | 7,8 | 0,84204545 | 289 | 9,09 | | 9,5 | 0 | 0,05 | 4,37 | 0,31 | 1,28 | | | 0,15 | 0,08 |
| 27 | sept-00 | ZB | 19,4 | 5 | 0,55969309 | 297 | 8,2 | | 9,1 | 0 | 0,28 | 2,13 | 0,52 | 0,88 | | | 0,01 | 0,04 |
| 28 | oct-00 | TR | 11,7 | 6,7 | 0,85223485 | 402 | 6,77 | | 12,5 | 16 | 0,08 | 3,3 | 0,33 | 0,49 | | | 0,25 | 0,2 |
| 29 | oct-00 | AV | 13 | 9,7 | 0,98816288 | 310 | 7,72 | | 9,3 | 1 | 0,26 | 3,3 | 0,11 | 0,15 | | | 0,06 | 0,05 |
| 30 | oct-00 | ZB | 14,1 | 7,3 | 0,74382576 | 296 | 7,12 | | 10,1 | 0 | 0,29 | 3,9 | 0,1 | 0,2 | | | 0,04 | 0,05 |
| 31 | nov-00 | TR | 10,3 | 8,4 | 0,79545455 | 314 | 6,88 | | 10,5 | 27 | 0,24 | 1 | 0,2 | 0,35 | | | 0,1 | 0,07 |
| 32 | nov-00 | AV | 10 | 7,5 | 0,70596691 | 336 | 6,5 | | 8,9 | 8 | 0,71 | 0,6 | 0,2 | 0,36 | | | 0,18 | 0,7 |
| 33 | nov-00 | ZB | 9,9 | 8,1 | 0,78090909 | 306 | 6,67 | | 9 | 13 | 0,59 | 1,1 | 0,12 | 0,22 | | | 0,04 | 0,05 |
| 34 | mai-02 | TR | 13,9 | 7,8 | 76 | 339 | 7,08 | 12 | | 7 | 0,02 | 1,8 | 0,24 | 0,309 | 10,5 | 9,7 | 0,646 | 0,112 |
| 35 | mai-02 | AV | 14,7 | 9,7 | 96 | 273 | 7,59 | 7,2 | | 11 | 0,055 | 1,1 | 0,1 | 0,073 | 9 | 8,9 | 0,175 | 0,076 |
| 36 | juin-02 | ZB | 14,1 | 7,76 | 75,8 | 319 | 7,18 | 15,1 | | 9 | 0,108 | 1,3 | 0,58 | 0,458 | 17,6 | 12,8 | 0,768 | 0,105 |
| 37 | juin-02 | TR | 16,5 | 9,16 | 94,5 | 276 | 7,77 | 11 | | 7 | 0,021 | 1 | 0,1 | 0,092 | 8,9 | 8,5 | 0,139 | 0,072 |
| 38 | juil-02 | AV | 15,2 | 6,1 | 62 | 299 | 6,97 | 3,6 | | 9 | 0,148 | 2,6 | 0,53 | 0,616 | 21,2 | 13 | 7,77 | 0,374 |
| 39 | juil-02 | ZB | 18 | 9 | 96 | 281 | 8,29 | 33,4 | | 5 | 0,023 | 2 | 0,1 | 0,072 | 9,3 | 9,2 | 0,193 | 0,275 |
| 40 | août-02 | TR | 18,9 | 4,8 | 52 | 386 | 7,12 | 2,3 | | 8 | 0,157 | 1,5 | 0,68 | 0,535 | 11,6 | 11,5 | 0,908 | 0,268 |
| 41 | août-02 | AV | 20,4 | 8,4 | 94 | 282 | 8,5 | 23,9 | | 1 | 0,081 | 1,8 | 0,1 | 0,115 | 11,1 | 10,4 | 0,124 | 0,103 |
| 42 | sept-02 | ZB | 18 | 6,6 | 69 | 386 | 7,05 | 44,1 | | 1 | 0,063 | 2 | 0,1 | 0,119 | 10,8 | 10,3 | 0,266 | 0,118 |
| 43 | sept-02 | TR | 19,7 | 8,7 | 94 | 283 | 8,66 | 19,7 | | 2 | 0,075 | 1,5 | 0,1 | 0,089 | 10,5 | 10,2 | 0,155 | 0,135 |
| 44 | sept-02 | AV | 19,8 | 4,5 | 50 | 380 | 6,96 | 7,3 | | 7 | 0,263 | 1 | 0,39 | 0,353 | 10 | 10 | 0,725 | 0,367 |
| 45 | sept-02 | ZB | 21 | 8,5 | 96 | 286 | 8 | 30,3 | | 1 | 0,14 | 1,6 | 0,1 | 0,087 | 11,1 | 10,6 | 0,179 | 0,143 |
| 46 | oct-02 | TR | 14,4 | 8,4 | 83 | 435 | 7,23 | 14,4 | | 2 | 0,421 | 2,3 | 0,1 | 0,433 | 14,7 | 14,1 | 1,47 | 0,115 |
| 47 | oct-02 | AV | 15,8 | 9,55 | 98 | 295 | 7,39 | 64,2 | | 2 | 0,215 | 1,9 | 0,1 | 0,128 | 11,4 | 9,8 | 0,443 | 0,172 |
| 48 | nov-02 | ZB | 13,9 | 9,4 | 94 | 305 | 6,9 | 4,4 | | 29 | 0,153 | 1,9 | 0,4 | 0,27 | 15,4 | 14,3 | 1,86 | 0,105 |
| 49 | nov-02 | TR | 13,7 | 9,7 | 97 | 307 | 7,4 | 2,9 | | 6 | 0,876 | 2,1 | 0,28 | 0,137 | 10,2 | 9,9 | 0,81 | 0,345 |

Annexe 2 – Herbar Electronique

Rorippa amphibia

Nom vernaculaire : Rorippe amphibie
ou Cresson amphibie

Famille : Brassicacées

Taille : de 0,50 à 1,50 m

Feuilles : lancéolées, dentées ou pennatilobées

Fleurs : fleurs de 6 mm, jaune vif

Habitat : Endroits humides, bord des cours d'eau



Lycopus europaeus

Nom vernaculaire : Lycope d'Europe ou Chanvre d'eau

Famille : Labiacées

Taille : de 0,20 à 1 m

Feuilles : lancéolées, profondément dentées lobées

Fleurs : petites (4 mm), ponctuées de pourpre,
en verticilles à l'aisselle des feuilles

Habitat : près des eaux douces, marécages



Juncus effusus

Nom vernaculaire : Jonc épars

Famille : Juncacées

Taille : de 0,30 à 1 m.

Feuilles : réduites à des gaines brunes à la base des feuilles

Fleurs : inflorescence latérale, près de l'extrémité la tige,
dressée ou étalée, verdâtre.

Habitat : prairies marécageuses, au bord des fossés



Mentha aquatica

Nom vernaculaire : *Menthe aquatique*

Famille : Labiacées

Taille : de 30 à 80 cm

Feuilles : ovales, pointues, dentées

Fleurs : lilas ou mauves en capitule terminal arrondi

Habitat : lieux humides, près des eaux douces



Lemna minor

Nom vernaculaire : Petite lentille d'eau

Famille : Lemnacées

Taille : de 1,5 à 5 mm

Morphologie : Fronde flottante presque plate des 2 côtés, avec une racine

Habitat : eau douce



Oenanthe crocata

Nom vernaculaire : Oenanthe safranée, Pensacre

Famille : Ombellifères

Taille : de 1 m à 1,50 m

Feuilles : 3-4 pennées à folioles cunéiformes dentées

Fleurs : blanches, parfois sans bractées

Habitat : prairies très humides, bord des ruisseaux



Ranunculus peltatus

Nom vernaculaire : Renoncule peltée

Famille : Renonculacées

Taille : atteignant 1,50 m de long

Feuilles : feuilles submergées ramifiées,
feuilles flottantes dentées légèrement

Fleurs : 10-20 mm, pétales en formes de poire

Habitat : eaux douces peu profondes, saumâtres



Phalaris arundinacea

Nom vernaculaire : Alpiste roseau ou Baldingère

Famille : Poacées

Taille : de 0,50 à 2 m

Feuilles : linéaire, avec une ligule à la base

Fleurs : panicule épillet

Habitat : lieux humides, bord de l'eau



Alisma plantago-aquatica

Nom vernaculaire : Plantain d'eau commun

Famille : Alismacées

Taille : de 0,20 à 1m

Feuilles : lancéolées, arrondies ou en cœur à la base

Fleurs : en verticilles, 8-10 mm, lilas pâle

Habitat : eaux douces



Callitriche sp.

Nom vernaculaire : Callitriche

Famille : Callitrichacées

Taille : de quelques cm à plusieurs dizaines de cm

Feuilles : ovales ou elliptiques, plus étroite et opaques quand elles sont submergées, opposées, formant souvent une rosette flottante.

Fleurs : minuscules, vertes, sans pétales, à l'aisselle des feuilles

Habitat : eaux douces dormantes, saumâtres, lentes



Lythrum salicaria

Nom vernaculaire : Salicaire commune

Famille : Lythracées

Taille : 0,30 à 1,50 m

Feuilles : opposées ou verticillées par 3, non dentées, sessiles, lancéolées

Fleurs : 10-15 mm, verticillées en épis, à 6 pétales, pourpre vif

Habitat : endroits humides, près des rivières



Salix sp.

Nom vernaculaire : Saule

Famille : Salicacées

Taille : arbres, arbustes ou arbrisseau

Feuilles : généralement alternes, dentées

Fleurs : petites sans pétales, munies d'une écaille, en chatons précédant souvent les feuilles ; fleurs ♂ et ♀ sur des plantes différentes

Habitat : taillis, bord de l'eau



Iris pseudacorus

Nom vernaculaire : Iris faux-acore, Iris des marais

Famille : Iridacées

Taille : jusqu'à 2 m

Feuilles : à nervures médianes

Fleurs : jaunes, 80-100 mm, groupées par 3

Habitat : endroits humides



Persicaria maculosa.

Nom vernaculaire : Persicaire

Famille : Polygonacées

Taille :

Feuilles : ochréa à la base des feuilles, feuilles alternes

Fleurs : petites, vertes, verticillées souvent rougissantes

Habitat : terrains nus, prés, près de l'eau



Solanum dulcamara

Nom vernaculaire : Douce-amère, Vigne de Judée

Famille : Solanacées

Taille : 2 m de long

Feuilles : ovales, pointues, souvent 2 lobes à la base

Fleurs : en panicule lâche, violet clair, pétales réfléchis,
anthères jaunes en colonne très saillantes

Habitat : haies, terrains vagues humides, bord des eaux douces



Aulus glutinosus

Nom vernaculaire : Aulne glutineux

Famille : Bétulacées

Taille : jusqu'à 25 m

Feuilles : arrondies, dentées, obtuses

Fleurs : chatons violacées ♂, pourpres ♀

Habitat : marécages, eaux douces



Urtica dioica

Nom vernaculaire : Grande ortie

Famille : Aristolochiacées

Taille : 0.30 à 1m

Feuilles : en cœur, dentées, opposées, plus longue que leur pétiole

Fleurs : vertes à étamines jaunes, en chatons, ♂ et ♀ sur fleurs différentes

Habitat : bois, terrains vagues



Cirsium sp.

Nom vernaculaire :

Famille : Astéracées

Taille :

Feuilles : oblongues ou lancéolées, pennées, épineuses à bords ondulés

Fleurs : capitule tubuliformes, en pinceau, pourpres

Habitat : terrains vagues



Rumex crispus

Nom vernaculaire : Patience crépue

Famille : Polygonacées

Taille : 0,30 à 1,50 cm

Feuilles : oblongues à bords fortement ondulés,
pas nettement en cœur à la base

Fleurs : inflorescence dense, valves ovales,
non dentées, généralement

Habitat : bois, terrains vagues, zones marécageuses



Myosotis scorpioides

Nom vernaculaire : Myosotis des marais

Famille : Boraginacées

Taille : 10 à 60 cm, bas à rampant

Feuilles : velues, entières, alternes

Fleurs : 4-10 mm, bleu ciel, rarement roses ou blanches,
planes, pétales émarginés

Habitat : endroits très humides



Carex sp.

Nom vernaculaire : Carex

Famille : Cypéracées

Taille :

Feuilles :

Fleurs : unisexuées

Habitat : tout type



Annexe 3 : Taux de recouvrement par quadrat des espèces végétales

| Nom vernaculaire | Genre Espèce | 18/05/2006 | | | | | | | | | | | | | | | 23/05/2006 | | | | | | |
|---------------------------------|----------------------|------------|----|----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 | Q5 | Q6 | Q7 | Q8 | Q9 | Q10 | Q11 | Q12 | Q13 | Q14 | Q15 | Q16 | Q17 | Q18 | Q19 | Q20 | Q21 | Q22 |
| Rorippa amphibie | Rorippa amphibia | II | II | II | III | III | II | IV | III | III | III | III | II | II | I | V | IV | III | III | III | I | II | III |
| Lycopus d'Europe | Lycopus europaeus | + | + | I | I | + | I | + | + | + | + | I | I | + | + | | + | | + | | | | |
| Jonc difflus | Juncus effusus | | I | II | | I | + | | + | I | + | I | + | + | | | + | | + | | | | |
| Menthe aquatique | Mentha aquatica | | | I | + | | | | + | + | | + | I | + | | | | | | | | | |
| Lentille d'eau | Lemna minor | I | | | + | + | + | II | + | + | II | + | I | + | + | | | | | | | IV | |
| Oenanthe safranée | Oenanthe crocata | | II | + | II | I | I | I | I | I | + | + | + | | | | | | + | | | | |
| Renoncule peillée | Ranunculus pellatus | I | | | | | | | + | + | | | | | | | | | | | | | + |
| Baldingère | Phalaris arundinacea | + | I | II | II | I | | I | + | + | I | + | II | | | | | | | | | | |
| Plantain d'eau commun | Alisma plantago-aq. | + | | | | | | | + | + | + | + | + | | | | | | | | | | |
| Rumex | Rumex sp. | | + | + | | + | | | | | + | I | I | | | | + | I | | | | | |
| Callitriche | Callitriche sp. | | | | | | | | | + | | | | | | | | | | | | | |
| Espèce I (Pousse) | | I | V | V | IV | II | | IV | I | I | I | II | II | II | | | | | | | | V | |
| Salicaire commune | Lythrum salicaria | I | + | | + | + | I | | + | + | + | + | | + | | | | | | | | | |
| Myosotis des marais | Myosotis scorpioides | | | I | | | | | + | + | | | | | | | | | + | | | | |
| Saule | Salix triandra | | | | | | | | | + | + | | | + | | | | | | | | | |
| Iris faux-acore | Iris pseudacorus | | | | | | | | | | | + | | | | | | | | | | | |
| Polygonacée | Persicaria sp. | | | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | I | |
| Douce-amère | Solanum dulcamara | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| Grande Ortie | Urtica dioica | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cirse | Cirsium sp. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Aulne glutineux | Aulus glutinosus | | | | | | | | | | | + | | | | | | | | | | | |
| Carex sp. | Carex sp. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Recouvrement de chaque parcelle | | III | V | V | IV | V | II | V | IV | IV | IV | V | V | III | I | V | V | IV | III | III | III | IV | V |

+: présence ; I : recouvrement (t) ≤ 5% ; II : 5% < t ≤ 25% ; III : 25% < t ≤ 50% ; IV : 50% < t ≤ 75% ; V : 75% < t

| | | 30/05/2006 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Nom vernaculaire | Genre Espèce | Q23 | Q24 | Q25 | Q26 | Q27 | Q28 | Q29 | Q30 | Q31 | Q32 | Q33 | Q34 | Q35 | Q36 | Q37 | Q38 | Q39 | Q40 | Q41 | Q42 | Q43 | Q44 | | |
| Rorippa amphibie | <i>Rorippa amphibia</i> | IV | V | II | V | I | I | II | I | + | I | I | III | I | IV | + | III | V | IV | III | IV | II | IV | | |
| Lycopus d'Europe | <i>Lycopus europaeus</i> | + | + | + | + | | + | + | | + | | I | + | + | + | + | | + | + | II | | | + | | |
| Jonc diffus | <i>Juncus effusus</i> | | | | | | | | III | | | | + | | | | | + | + | | | | I | | |
| Menthe aquatique | <i>Mentha aquatica</i> | | | | | | + | | I | | + | | | | | | | + | | | | | | | |
| Leontide d'eau | <i>Leontodon minor</i> | + | II | II | + | | | | | | | | II | | | | | | | | I | + | | | |
| Oenanthe safranée | <i>Oenanthe crocata</i> | + | + | + | + | | | | | | | | | | | | | | | | + | + | | | |
| Ranuncule peltée | <i>Ranunculus peltatus</i> | | | | | | | + | | | | | | | | | + | | | | + | + | | | |
| Baldingère | <i>Phalaris arundinacea</i> | + | | + | | | | | + | + | + | | | + | I | | + | I | | I | I | + | I | | |
| Plantain d'eau commun | <i>Alisma plantago-aq.</i> | + | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Rumex | <i>Rumex sp.</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | | |
| Callitriche | <i>Callitriche sp.</i> | | | | | | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Espèce 1 (Pousse) | | II | IV | | III | | | | V | | | | IV | V | V | + | I | IV | | V | IV | | IV | | |
| Salicaire commune | <i>Lythrum salicaria</i> | | + | + | + | | | | | | | + | | | + | + | | | | | + | | | | |
| Myosotis des marais | <i>Myosotis scorpioides</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Saule | <i>Salix triandra</i> | + | + | I | | I | I | + | | | + | | | | | | I | | | | + | + | | | |
| Iris faux-acore | <i>Iris pseudacorus</i> | | | | | | | | + | | | | | | | | | | | I | + | | | | |
| Polygonacée | <i>Persicaria sp.</i> | | | | | | | | I | | | | | I | I | | | | + | + | | | + | | |
| Douce-amère | <i>Solanum dulcamara</i> | | + | | + | | | | III | | | | + | | | | + | | I | + | + | | | | |
| Grande Ortie | <i>Urtica dioica</i> | | | | | | | | + | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cirse | <i>Cirsium sp.</i> | | | | | | | | II | | | | | | | | | | | I | | | | | |
| Aulne glutineux | <i>Aulus glutinosus</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Carex sp. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Recouvrement de chaque parcelle | | V | V | III | V | II | II | II | | V | I | I | V | V | V | I | III | V | V | V | V | II | V | | |

| 30/05/2006 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 31/05/2006 | | |
|---------------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|------------|-----|-----|
| Nom vernaculaire | Genre Espèce | Q45 | Q46 | Q47 | Q48 | Q49 | Q50 | Q51 | Q52 | Q53 | Q54 | Q55 | Q56 | Q57 | Q58 | Q59 | Q60 | Q61 | Q62 | Q63 | Q64 | Q65 | Q66 |
| Rorippa amphibie | <i>Rorippa amphibia</i> | II | | III | III | | | | | | | | | | | | | | | | III | I | III |
| Lycopus d'Europe | <i>Lycopus europaeus</i> | II | | | | | | | I | I | + | + | + | + | + | I | I | I | + | | + | | |
| Jonc diffus | <i>Juncus effusus</i> | | | | | | | + | | | | | | | | | | BOR | BOR | | | | |
| Menthe aquatique | <i>Mentha aquatica</i> | | | | | | | | | | | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | |
| Lentille d'eau | <i>Lemna minor</i> | + | | I | | | | | + | | | | | | | | | + | + | | | | |
| Oenanthe safranée | <i>Oenanthe crocata</i> | | | | | | | | | | | + | + | | | | I | + | + | | + | + | + |
| Rennoucle pelée | <i>Ranunculus pellatus</i> | + | | I | | + | + | + | | | | | | | | | | | | | I | I | II |
| Baldingère | <i>Phalaris arundinacea</i> | + | | I | + | + | + | I | | | I BOR | | + | + | + | + | + | BOR | BOR | BORDURE | + | + | + |
| Plantain d'eau commun | <i>Alisma plantago-aq.</i> | | | | | + | | | + | + | | + | | | | | + | | | | | | |
| Rumex | <i>Rumex sp.</i> | | | | | | | | | | + | | | | | | | | | | | | |
| Callitriche | <i>Callitriche sp.</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Espèce 1 (Pousse) | | | | | V | | I | IV | | | V | IV | V | II | III | I | II | IV | | | II | | |
| Salicaire commune | <i>Lythrum salicaria</i> | | | | | | | | | | + | + | + | | | II | III | V | V | | | | |
| Myosotis des marais | <i>Myosotis scorpioides</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | + | + | | | | |
| Saule | <i>Salix triandra</i> | | | | | + | + | | I | + | | + | + | | | + | III | I | + | | + | | |
| Iris faux-acore | <i>Iris pseudacorus</i> | | | | | | | | + | | | | | | | | | BOR | BOR | | | | |
| Polygonacée | <i>Persicaria sp.</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Douce-amère | <i>Solanum dulcamara</i> | | | | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Grande Ortie | <i>Urtica dioica</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | I | | |
| Cirse | <i>Cirsium sp.</i> | | | | + | | | | | | | | | | | | | | | | + | | |
| Aulne glutineux | <i>Aulus glutinosus</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Carex sp. | <i>Carex sp.</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Recouvrement de chaque parcelle | | II | 0 | III | V | III | II | V | III | II | V | IV | V | V | V | V | V | V | V | | IV | II | V |

| 31/05/2006 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Nom vernaculaire | Genre Espèce | Q67 | Q68 | Q69 | Q70 | Q71 | Q72 | Q73 | Q74 | Q75 | Q76 | Q77 | Q78 | Q79 | Q80 | Q81 | Q82 | Q83 | Q84 | Q85 | Q86 | Q87 | Q88 |
| Rorippa amphibia | <i>Rorippa amphibia</i> | + | III | I | I | II | + | II | V | II | + | + | II | I | I | + | II | + | + | II | + | I | |
| Lycopus d'Europe | <i>Lycopus europaeus</i> | | | | | + | + | + | + | | | | | | | | | | + | + | + | | |
| Jonc diffus | <i>Juncus effusus</i> | | | | | | | | | | | | | | | | II | | | + | + | | |
| Menthe aquatique | <i>Mentha aquatica</i> | | + | + | + | | | | | | + | + | | + | + | + | I | | | + | + | + | |
| Lentille d'eau | <i>Lemna minor</i> | + | II | II | | | II | V | | + | IV | | I | I | + | + | | | | | I | + | |
| Oenanthe safranée | <i>Oenanthe crocata</i> | | + | | | | | | | | | | | | | + | + | | | | | + | |
| Renoncule peltée | <i>Ranunculus peltatus</i> | + | II | IV | I | | | + | | | | | | | | + | + | | | + | | + | |
| Baldingère | <i>Phalaris arundinacea</i> | + | + | + | + | + | | | + | | + | + | + | + | + | + | + | | | | I | | |
| Plantain d'eau commun | <i>Alisma plantago-aq.</i> | + | | | | | | | | | | | | | | | + | | | | | | |
| Rumex | <i>Rumex sp.</i> | | | | | + | | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| Callitriche | <i>Callitriche sp.</i> | | | | | | + | | | | | | | | | + | I | + | | | | | |
| Espèce 1 (Pousse) | | | | | | V | | | III | | | III | | | | | + | + | | V | IV | + | |
| Salicaire commune | <i>Lythrum salicaria</i> | | + | | | | | | + | + | | | | + | | | | | | + | II | | |
| Myosotis des marais | <i>Myosotis scorpioides</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Saule | <i>Salix triandra</i> | + | | | | | + | I | + | + | + | III | III | I | + | V | IV | + | V | I | III | I | |
| Iris faux-acore | <i>Iris pseudacorus</i> | | | | | | | | | | + | | + | + | | | + | | | + | + | | |
| Polygonacée | <i>Persicaria sp.</i> | | | | | + | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Douce-amère | <i>Solanum dulcamara</i> | | | | | + | | | | | | | | | | + | | | | + | | | |
| Grande Ortie | <i>Urtica dioica</i> | | | | | + | | | | | | | | | | | | | | + | | | |
| Aulne glutineux | <i>Aulus glutinosus</i> | | | + | + | | | | | | | | | | | | | | | | II | | |
| Carex sp. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Recouvrement de chaque parcelle | | II | V | IV | III | V | III | V | V | II | IV | V | III | II | II | V | V | + | V | V | V | II | V |

| | | 31/05/2006 | | | | | | | | | | 01/06/2006 | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Nom vernaculaire | Genre Espèce | Q89 | Q90 | Q91 | Q92 | Q93 | Q94 | Q95 | Q96 | Q97 | Q98 | Q99 | Q100 | Q101 | Q102 | Q103 | Q104 | Q105 | Q106 | Q107 | Q108 | Q109 | Q110 |
| Rorippa amphibie | <i>Rorippa amphibia</i> | | + | | | + | | I | + | | | | + | II | | II | II | IV | I | III | | | |
| Lycopus d'Europe | <i>Lycopus europaeus</i> | II | IV | III | IV | IV | IV | III | III | III | + | + | + | I | | + | + | I | | + | + | + | |
| Jonc diffus | <i>Juncus effusus</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Menthe aquatique | <i>Mentha aquatica</i> | + | III | + | III | III | + | | | | | | + | + | + | | + | + | | + | | III | IV |
| Lentille d'eau | <i>Lemna minor</i> | | | II | | | | | + | | | | + | + | + | | | | + | | | | + |
| Oenanthe safranée | <i>Oenanthe crocata</i> | | + | | | + | | | | | | | + | | | | | | | | | | + |
| Renoncule pelée | <i>Ranunculus peltatus</i> | | | | | | | | | | | | | | + | | + | | | | | | |
| Baldingère | <i>Phalaris arundinacea</i> | | + | | | | | | | | | + | + | | | | + | + | + | + | | | |
| Plantain d'eau commun | <i>Alisma plantago-aq. commun</i> | | + | + | | | | | | + | | | + | | | + | | + | | | + | + | |
| Rumex | <i>Rumex sp.</i> | | + | | | | | | | | | | | | | | | | + | | | + | |
| Callitriche | <i>Callitriche sp.</i> | | | I | | | I | + | + | | + | | + | I | | | | | | | | + | |
| Espèce I (Pousse) | | | IV | | I | II | | | | | | | | | | | II | IV | | III | | | |
| Salicaire commune | <i>Lythrum salicaria</i> | | + | | | + | | | | | | | + | | | | + | + | + | + | | | |
| Myosotis des marais | <i>Myosotis scorpioides</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | I | III |
| Saule | <i>Salix triandra</i> | V | I | V | III | I | V | III | II | II | IV | + | II | II | | + | | | | | + | I | III |
| Iris faux-acore | <i>Iris pseudacorus</i> | | + | | | | | | | | + | + | + | + | | | | | | | | | + |
| Polygonacée | <i>Persicaria sp.</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | + | | | | | |
| Douce-anêre | <i>Solanum dulcamara</i> | | + | | | + | | | | | | + | | | | | | | | | | | |
| Grande Ortie | <i>Urtica dioica</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | | | |
| Cirse | <i>Cirsium sp.</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Aulne glutineux | <i>Aulus glutinosus</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Recouvrement de chaque parcelle | Carex sp. | V | V | V | V | V | V | IV | V | III | V | I | III | II | + | II | III | V | I | IV | + | IV | IV |

| Nom vernaculaire | Genre Espèce | 01/06/2006 | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|------------|-----|-----|-----|-----|
| | | Q11 | Q12 | Q13 | Q14 | Q15 |
| Rorippa amphibia | <i>Rorippa amphibia</i> | III | + | | | |
| Lycopus d'Europe | <i>Lycopus europaeus</i> | I | + | + | + | + |
| Jonc diffus | <i>Juncus effusus</i> | | + | | | + |
| Menthe aquatique | <i>Mentha aquatica</i> | + | + | | | |
| Lentille d'eau | <i>Lemna minor</i> | | | | | |
| Oenanthe safranée | <i>Oenanthe crocata</i> | | | | | |
| Renoncule peignée | <i>Ranunculus peltatus</i> | | | + | + | |
| Baldingère | <i>Phalaris arundinacea</i> | I | | | | |
| Plantain d'eau commun | <i>Alisma plantago-aq.</i> | | + | | | |
| Rumex | <i>Rumex sp.</i> | | | | + | + |
| Callitriche | <i>Callitriche sp.</i> | | | | | |
| Espèce I (Pousse) | | III | | | | |
| Salicaire commune | <i>Lythrum salicaria</i> | + | + | | | |
| Myosotis des marais | <i>Myosotis scorpioides</i> | | | | | |
| Saule | <i>Salix triandra</i> | | + | + | + | III |
| Iris faux-acore | <i>Iris pseudacorus</i> | | | | | |
| Polygonacée | <i>Persicaria sp.</i> | | | | | |
| Douce-amère | <i>Solanum dulcamara</i> | + | | | | |
| Grande Ortie | <i>Urtica dioica</i> | | | | | |
| Cirse | <i>Cirsium sp.</i> | + | | | | |
| Aulne glutineux | <i>Aulus glutinosus</i> | | | | | |
| | <i>Carex sp.</i> | | | | | |
| Recouvrement de chaque parcelle | | IV | I | + | + | IV |

Annexe 4 : Avis des Rapporteurs

Jacques Frère
Professeur, Responsable de l'équipe de Microbiologie de l'Eau
UMR CNRS 6008 – Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau
40, av du Recteur Pineau
86022 POITIERS Cedex



10 juin 2009

Rapport sur le mémoire de thèse de Monsieur De Nardi

Monsieur Frédéric DE NARDI présente un manuscrit intitulé « Excès de Phosphore et de Matières organiques naturelles dans les eaux de retenues : diagnostic et remèdes. Cas du lac de Ribou à Cholet » en vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université d'Angers.

Ce manuscrit est présenté pour une nouvelle lecture aux rapporteurs, après que des corrections lui aient été demandées. Ce nouveau document suit globalement le même plan que la version précédente, mais l'ensemble des corrections proposées par les rapporteurs y ont été introduites.

Les modifications principales portent sur la bibliographie, sur une meilleure discussion dans certaines parties du texte et sur l'ajout :

- d'un résumé en français,
- d'un court chapitre sur les outils de mesure de l'épaisseur des biofilms et sur les méthodes de dénombrement bactérien,
- d'une conclusion mieux étoffée.

La description du document reste donc globalement similaire à celle que j'ai proposée dans mon premier rapport.

Synthèse bibliographique : cette partie du document introduit la notion de qualité des eaux de surface, puis la problématique associée à la présence du phosphore et la matière organique dans les eaux naturelles, puis les macrophytes en tant qu'indicateurs de la qualité des eaux et comme épurateurs et enfin, les biofilms.

Matériel et méthode : pour la réalisation de cette étude, monsieur De Nardi a du recruter des méthodes d'analyse touchant la botanique, la physico-chimie, la microbiologie et enfin les mathématiques pour le traitement des données. Certaines approches expérimentales sont assez superficiellement présentées.

Premier chapitre de résultats : ("III : diagnostic sur le lac Ribou") Un inventaire floristique est établi puis les biofilms épyphytiques sont étudiés. Une composition microbienne et chimique de ces biofilms est présentée. Cette étude montre que certains points du lac sont plus eutrophisés que d'autres et qu'ils pourraient plus facilement de ce fait favoriser le développement de biofilms. Des essais de développement de biofilms sur support inertes

(bambou, plastique) ont ensuite été mis en œuvre. Les biofilms pourraient donc être des marqueurs du milieu naturel associés à la qualité de l'eau.

Deuxième chapitre de résultats : (IV : impacts des biofilms sur des eaux naturelles anthropisées") Ce chapitre présente l'impact de biofilms établis dans des pilotes de laboratoire sur les eaux. Les biofilms n'ont pas montré de capacité d'épuration dans les conditions mises en œuvre. Cependant, la composition des eaux a subi une modification très probablement imputable à ces biofilms.

Troisième chapitre de résultats : (V : élargissement de l'étude à l'échelle de bassin versant et du laboratoire") Ce chapitre présente des résultats globaux sur l'ensemble des stations analysées sur le lac de Ribou et une synthèse au niveau du bassin versant. D'autre part, la capacité épuratoire des biofilms produits en réacteur en laboratoire à partir des eaux du lac est brièvement présentée.

Chapitre de discussion (9 pages) : ce chapitre, nouveau par rapport à la précédente version du manuscrit, reprend les différents éléments pertinents relevés dans l'étude et en discute l'intérêt.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale, suivie de brèves perspectives.

Ce travail correspond à une approche pluridisciplinaire d'un environnement naturel complexe. Il a recruté de nombreuses techniques couvrant des champs disciplinaires très différents. De plus l'ensemble du manuscrit montre le travail conséquent qui a été réalisé dans cette étude. On ne peut donc que féliciter Monsieur De Nardi pour l'effort important que représente cette approche pluridisciplinaire, bien que persistent encore dans le manuscrit certaines lacunes mineures.

Ce travail a permis la rédaction d'un article scientifique soumis à *Water Research* et un autre à une revue française. J'émet donc un avis favorable à la soutenance de thèse de Monsieur Frédéric De Nardi en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université d'Angers.



Professeur Jacques Frère



Rapport de thèse

Excès de Phosphore et de Matières organiques naturelles dans les eaux de retenues : Diagnostic et remèdes.

**Manuscrit de thèse de Frédéric DE NARDI
– Soutenance prévue le 10 Juillet 2009 à Cholet**

**Par le Professeur Jacques HAURY – UMR INRA-
AGROCAMPUS OUEST Ecologie et Santé des Ecosystèmes**

10 Juin 2009

Le sujet est particulièrement compliqué par la diversité des approches et échelles qu'il implique. Le titre fait ressortir l'ambition d'une approche transversale pour l'établissement d'un diagnostic et la proposition de remèdes.

Le document a été remanié en prenant en considération les premiers rapports des deux rapporteurs. Le présent rapport a été rédigé en reprenant point par point les remarques antérieures. Il suit donc le même plan.

Le document produit (ensemble de 6 chapitres d'importance inégale) est intéressant et témoigne à la fois :

- d'une grande quantité de travail,
- d'un essai d'analyses multi-compartiment et multi-échelle correspondant à l'approche transversale affichée
- de données intéressantes pour les biofilms,
- d'un croisement de méthodes d'approche en laboratoire, croisement qui semble donc pertinent au vu des résultats obtenus,
- de processus intéressants quant au fonctionnement des relations qualité d'eau/milieus physiques/biofilms/macrophytes : dénitrification, réduction de la matière organique, modification des molécules,
- de l'intérêt du croisement d'échelle,
- de perspectives intéressantes quant à l'abattement des pics de pollution.

Ce document est bien amélioré par rapport au document antérieur.

* du point de vue de l'organisation générale du document :

- le résumé français a été fourni, mais il est d'usage de fournir également un résumé en anglais,
- la bibliographie a été complétée (même s'il manque encore des éléments pour certaines références) et réutilisée à la fois pour poser les hypothèses et dans un chapitre séparé correspondant aux standards d'une discussion,
- cette discussion est désormais satisfaisante,
- la bibliographie est désormais complète, et plus homogène,
- pour l'hydrobiologie, elle est un peu améliorée.

* du point de vue du fond du document et de la démarche :

- l'approche d'écologie végétale est peu pertinente par rapport à la question posée, mais mieux replacée en perspective,
- la problématique générale et les compartiments étudiés, ainsi que ceux qu'on ne prend pas en considération ont été partiellement replacés dans un cadre (conceptuel) général, ce qui permettra de formuler les objectifs et hypothèses (cf infra)
- les hypothèses ne sont pas précisées ni pour l'ensemble, ni expérimentation par expérimentation,
- les outils statistiques sont peu utilisés (pratiquement pas d'utilisation explicite de tests statistiques, alors que l'auteur précise qu'il y a des différences significatives ou non significatives), mais les compléments demandés ont été apportés,
- les changements d'échelle et l'articulation entre les différentes analyses sont précisées, et mieux mises en perspective par rapport aux questions posées, et certaines échelles (zones humides, bassin versant, ensemble du lac, station d'étude, macrophytes, biofilms, phytoplancton) sont un peu mieux replacées les unes par rapport aux autres,
- la vraie discussion des résultats par rapport aux hypothèses initiales a été effectivement établie, même si elle pourrait encore être améliorée.

Approche analytique du document

- La conclusion et les perspectives qui correspondent encore plutôt à un résumé, mais le fait d'avoir élaboré une discussion plus approfondie aide à sa lecture. Cette rédaction est liée à un résumé succinct d'une seule page.
- La bibliographie : aux 142 références initiales, l'auteur en a rajouté 29 en éliminant un certain nombre de celles qu'il avait utilisées antérieurement..
- L'introduction fait mieux appel à une bibliographie générale, commence à présenter le milieu d'étude, et les redondances sont amoindries.
- Le chapitre I de synthèse bibliographique est intéressant, et présente désormais un cadre conceptuel auquel l'impétrant se réfère pour conduire son travail. Il a été enrichi par de la bibliographie générale en hydrobiologie sur les macrophytes, le plancton, mais aussi sur le fonctionnement d'un bassin versant (grand oublié de la démarche). En revanche, la partie biofilms et biochimie est particulièrement fouillée. **On peut regretter que des données sur le lac de Ribou y soient présentées, alors que le milieu d'étude n'a pas encore fait l'objet d'une présentation formelle. Cette remarque n'a pas été prise en considération, d'où l'impression de redite**
- Le chapitre II commence par une présentation du lac de Ribou qui perd de sa pertinence puisque l'auteur l'a déjà plus ou moins déjà présenté antérieurement (tout en éliminant la présentation dès l'introduction). En revanche, le lac est bien replacé par rapport au bassin versant, ce qui justifie d'ailleurs la problématique de la thèse, mais sans soulever la question des espaces clés de régulation de la pollution. Quelques

éléments complémentaires ont été apportés quant à la bathymétrie de la retenue, au régime hydrologique et à la variation des débits. La question des sédiments n'est pas du tout abordée, ce qui est dommageable quant à la réflexion générale. La méthodologie d'étude des macrophytes (méthode phytosociologique) est inappropriée pour des études fonctionnelles car elle est beaucoup trop descriptive et ne permet pas de quantification. Il aurait au moins fallu des études minimales de structures de végétation et d'estimation des recouvrements voire des biomasses. La partie analyses des biofilms et surtout protocoles de laboratoire, domaine de spécialité du doctorant semble en revanche particulièrement claire, adaptée et faisant référence à des travaux récents. **Dans le chapitre III, il est toujours bizarre d'y trouver le traitement de données**, et on peut s'étonner que l'auteur se limite à des analyses en composantes principales, et ne présente pas de corpus de tests statistiques lui permettant de tester la signification statistique de ses résultats. Cette partie méthodologie devrait figurer dans le chapitre précédent.

- Le chapitre III est le chapitre central qui permet le transfert d'échelle des peuplements macrophytiques (9 p.) aux biofilms (21 p.) en passant par la chimie des eaux (4 + 1 p). **Le chapitre III donne des résultats très intéressants**, même s'ils sont entachés, pour les macrophytes, d'une forte imprécision liée à la méthodologie choisie. Il est à noter que certains résultats sont discutés de façon superficielle au fur et à mesure de leur présentation. Pour la chimie, il aurait été intéressant d'avoir les deux échelles du lac et du bassin versant, associées aux débits. Par ailleurs, la présentation de la chimie se fait en deux endroits, au début du chapitre, mais aussi lors de la présentation des résultats floristiques, ce qui n'est pas très logique. La présentation des biofilms en terme de composition floristique et chimique est beaucoup plus travaillée et informative : elle témoigne à la fois de la quantité et de la qualité du travail et de l'aptitude du doctorant à croiser des méthodes et échelles complémentaires. L'intérêt du couplage « vraies plantes » / support plastique est très justement souligné.
- Le chapitre IV « Impacts des biofilms sur des eaux naturelles anthropisées » est plus long (60 p.) et présente différentes études expérimentales réalisées en bio-réacteurs (19 p.), des résultats de terrain (8 p.) ainsi que des analyses détaillées de la chimie des biofilms (12 p.) et de leur compositions floristique (18 p.).
- L'ancien chapitre V « Discussion et perspectives à l'échelle de bassin versant et du laboratoire » est désormais dissocié entre des résultats liés au transfert d'échelle correspondant au « bilan bassin versant » et une discussion (chapitre VI) mieux charpentée sur la problématique d'ensemble. Toutefois l'articulation entre biofilms, macrophytes et phytoplancton est insuffisante et les analyses réalisées en laboratoire apparaissent comme trop déconnectées de la question initiale. Les deux études ponctuelles sont présentées dans le sous-chapitre V2 : diagnostic et remède à l'échelle du laboratoire : une étude de biodégradation d'un produit de dégradation d'un pesticide (et où est alors la question des matières organiques naturelles du titre) et une étude de dopage des biofilms par les nitrates sont présentées comme des amorces d'innovation.
- La discussion (chapitre VI) est désormais correcte, intègre des éléments bibliographiques et souligne à la fois la complexité du problème et le caractère embryonnaire des préconisations en signalant que si on « piège » le phosphore avec des supports inertes, il faut les retirer pour épurer, ...
- La conclusion générale reprend la démarche et replace l'historique de l'ensemble des travaux en présentant leur logique et les principaux résultats obtenus. Elle se termine par des perspectives où l'auteur insiste sur l'intérêt de poursuivre les analyses et suggère à la fois de limiter les apports amont, de continuer le suivi et le diagnostic.

Au vu de cette approche analytique, il apparaît que les problèmes de cohérence d'ensemble mis en évidence antérieurement sont amoindris, avec plus de clarté dans la démarche.

Avis d'ensemble du rapporteur

En conséquence de l'analyse détaillée du document, **l'avis du rapporteur est désormais favorable sans réserve à la soutenance du travail dans sa nouvelle version.**

Il souligne le courage de l'impétrant pour reprendre son manuscrit de façon plus synthétique (même s'il pourrait encore être amélioré), ce qui lui permet de mieux mettre en valeur les résultats, l'originalité du sujet et de la démarche, ainsi que des réponses aux ambitions affichées dans le titre de la thèse.

Par ailleurs, la liste des productions de la thèse s'est désormais enrichie d'un article soumis à *Water Research*, qui témoigne d'un réel effort de valorisation des travaux.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Haury', with a long horizontal stroke extending to the right.

Professeur Jacques HAURY